



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

***Papel del ligando no canónico de NOTCH
parecido a Delta 1 (DLK1) en el daño renal
experimental***

Tesis doctoral

Laura Márquez Expósito

Madrid 2021

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

***Papel del ligando no canónico de NOTCH
parecido a Delta 1 (DLK1) en el daño renal
experimental***

***Memoria que presenta la graduada en Bioquímica
Laura Márquez Expósito
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de
Madrid***

**Directores de Tesis: Marta Ruiz-Ortega y Raúl Rodrigues Díez
Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz
Universidad Autónoma de Madrid**

A mi hermana Cristina

A mis padres

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara esa gota"
(Madre Teresa de Calcuta)

“夢を 抱きしめろ”

“Yume o dakishimero”

“Abraza tus sueños”

(Zack, *Final Fantasy VII*)

AGRADECIMIENTOS

Recuerdo una vez por el año 2013, mientras buscaba tutor de TFG, que en una de las entrevistas me preguntaron si yo tenía intención de hacer “el doctorado”. Claro, por aquel entonces ni sabía si iba a hacer máster y esas palabras se me quedaban muy grandes, así que dije que no. Quién me hubiera dicho por aquel entonces que, en el 2021 (y en mitad de una pandemia mundial), iba a estar escribiendo estas líneas como parte de mi tesis. Así que *allé* voy.

La verdad es que toda mi formación académica ha sido como una aventura, sin muchos altibajos (hasta bachiller... y la PAU), ya que yo era una de las empollonas de la clase, y la verdad es que no me arrepiento, porque a lo mejor gracias a que me dediqué en cuerpo y alma a estudiar, estoy aquí. Así que creo que debería empezar agradeciéndole en mi etapa de la ESO y Bachiller en el Rosa Chacel a mi profesor de biología Joan Daniel, ya que él me enseñó a amar la biología y entenderla de una manera que ningún otro profesor ha sabido, y creo que él es el que me encendió un poquito la llama de “irme por ciencias en vez de por letras”, ya que yo tampoco lo tenía muy claro y me gustaban ambas ramas. También a Lidia, que se portó siempre muy muy bien conmigo, y también me enseñó a amar la música. Y qué seríamos las personas sin la música (especial mención aquí también a Itziar, mi profesora de música en primaria).

Así que llegamos a la carrera después de sonrisas y llantos con la nueva PAU (que no se me dio tan mal, he de decir), al grado de bioquímica de la UAM, primer año que se estrenan los grados. Mi madre de un tiempo a esta parte lleva diciéndome que se alegra muchísimo de que no me diera la nota de corte para hacer medicina, porque ahora estaría pasándolo bastante mal siendo médico, y tiene toda la razón. La verdad es que nunca me arrepentí de no haber hecho medicina, y no me ha quedado ninguna espinita clavada. En parte, también ha sido por los compañeros tan maravillosos que compartieron conmigo los 4 años de carrera, y que llevo mucho mucho tiempo sin verlos. A los chicos, Mario, Guille, Diego, Javi y Ramón. Mario, me alegró mucho ver una cara conocida entre mis compañeros de clase de carrera, ya que los dos veníamos del mismo instituto y del mismo barrio (¡¡Viva Hortaleza!! Me abstendré de decir la rima). Guille, toda una sorpresa, detrás de esa cara seria ese amor por los juegos de mesa y los videojuegos (¡como yo!), me acuerdo la última vez que quedamos pre-covid, cuando ya estaba por China, jugando a Virus, y nosotros estábamos ajenos a todo, parece que lo hubiéramos invocado. Diego, a veces te llamaba Al, dependía del día, aún recuerdo cuando jugábamos al mus en clase de cuando en cuando, y cuando te cortaste esa melenaza rubia que tenías porque querías un cambio (viva el pelo largo en los chicos jaja). Javi, el artista del grupo, me encantaba ir a verte a las obras de teatro, he visto tantas que ni me acuerdo (la última la del Baile de los Vampiros), pero espero poder volver a verte pronto en alguna de tus obras!! ¡Me encantaba cuando traías juegos a clase, el Jungle Speed y el Bang! los conocí gracias a ti y me lo pasaba genial en esos ratitos entre clases y prácticas cuando nos tirábamos todo el día en la facultad. ¡¡Ramón!! El canario, ese pedazo viaje que hicimos a tu tierra en fin de curso, ¡adoro tu tierra y tu acento! Hace mil que no te veo, pero menos mal que te pillé por Instagram no hace mucho y me alegra saber que estás bien. Muchas gracias, chicos. Y ahora toca a mis chicas, con las que tengo un poco más de contacto, y qué ganas tengo de veros y hacer nuestras quedadas para hablar de Henry Cavill o de Tom Hiddleston (y de arreglar el mundo también, no solo hablamos de actores guapos...). Gema, probablemente no lo recuerdes, pero me dejaste unos apuntes de OCCII y pasé de un 4,5 a un 7,5. ¡Tus apuntes me salvaron ese examen! Patricia, o Pa, blogera de su viaje a Japón, me gustaba mucho leer las entradas que hacías hablando de tu viaje, porque me recordaba al viaje que hice hace ya bastantes años. Espero volver algún día, seguro que tú también repetirías. Marisa, nuestra viajera Londinense, me preocupé mucho por ti cuando hicieron el ataque terrorista allí al lado del Big Ben, menos mal que no te pasó nada. Déjate ver de vez en cuando por España. Marta, la chica de la voz dulce, me encanta tu sarcasmo, también amante de lo oriental y de los videojuegos. Recuerdo el día que nos explicaste lo de los parabenos del champú, no sé por qué se me quedó grabado a fuego, ahora cada vez que leo esa palabra me acuerdo de ti, y no sufro por comprarme champús con parabenos, mientras el resto del mundo sigue preocupado. Alba, conecté contigo en el momento en el que hablamos de música y a ambas nos gustaba “30 Seconds To Mars”, yo estaba encantada de que a alguien más le gustaran esos grupos de música de Rock alternativo como a mí. Gracias por ayudarme tanto durante la carrera con las dudas y los apuntes. Albita, mi Albita, he de

confesar que al principio de la carrera me dabas un poco de miedo porque eras muy seria y distante, pero después te conocí y descubrí que eras una persona maravillosa al que tengo un gran cariño. Recuerdo esas prácticas donde casi siempre estábamos en los mismos grupos por el apellido (Marín y Márquez, sí aun me acuerdo de los apellidos...). Y a mi compañera de prácticas y de trabajos, Ana, que después coincidí contigo en la Fundación y me dio mucha alegría verte por allí por Reuma y ver que te ha ido tan bien. Recuerdo el trabajo ese que hicimos juntas en genética sobre el ataque del 11-M, que la profesora nos felicitó porque le gustó mucho. Gracias por ser mi compi de prácticas y de trabajos 😊 A todos mis compis de carrera, cuando nos íbamos todos a los bajos de Argüelles (¡cómo lo echo de menos!), o quedábamos para los cumpleaños. Y con mis chicas, la última que nos vimos fue un 8 de marzo de 2020 haciendo un Scape Room, espero que podamos repetir dentro de poco. ¡¡¡Gracias a todos!!!

Los que me conocen bien saben que mi amor por Japón llegó a límites insospechados y decidí tomar clases de japonés como hobby a la vez que hacía la carrera. Sí, he de decir que es una locura estudiar una carrera así y luego además un idioma que no tiene nada que ver con el tuyo. Pero a la gente que me llevé yo de las clases de japonés son de esas personas de las que no te quieres desprender de lo divertidas y locas que están, igual que tú. Y cuanto me alegro de que hiciéramos la piña tan grande que hicimos, que empezó en 2010 y estamos en 2021 y aún sigue (y espero que siga por siempre, la verdad). Aún me acuerdo cuando empezamos las clases con Mariló-sensei y su maleta, que nos liaba para hacer todo tipo de actividades, y hasta hicimos una obra de teatro en japonés, qué locura, pero lo bien que lo pasábamos. ¡Recuerdo que el protagonista (Momotaro) era mi Andrésín, mi Andrés-Kyun! (aún estás así como contacto de móvil jaja). Qué persona tan alegre y maravillosa eres, ya sabes que te adoro y que adoro tu locura. Cómo te eché de menos cuando te fuiste a estudiar a Zaragoza, menos mal que pude ir a verte, y que luego volviste a Madrid. Todavía nos debemos unas cerves/quedada, espero que sea muy temprano. Gracias por tus sonrisas, tus berradas y por apoyarme en los malos momentos. Siempre me reía mucho cuando te juntabas con Sandrita y os poníais a hacer el tonto. Sandrita-san, mi “maridita” siempre me ha encantado escuchar tus historias de “jincha” y sabes que siempre me lo paso genial contigo. Me has enseñado tantas cosas de Japón y del japonés cuando ibas a la carrera de Estudios de Asia a la vez que yo, que siempre me quedaba pensando, “y por qué no me habré metido yo en esta carrera”. Qué bien nos lo pasábamos en los expomangas disfrazadas, aún tengo la foto de portada de manga que me regalaste de nosotras dos. Estoy deseando verte y compartir más historias contigo. Roberto, tú me quitaste el título de “maridita” pero no me pongo celosa, me ha gustado mucho conocerte y hablar de videojuegos contigo. Javi, el artista del grupo, tú que pareces que te has escapado de los Beatles o a veces de Dragon Ball, me encanta oírte cantar (y lo sabes). ¡Gracias por grabarme la canción de Hollow que te pedí! Me la pongo de cuando en cuando, porque me encanta la versión que hiciste. Andrea, la manager de Javi, aún recuerdo cuando Javi nos presentó hace tiempo en Plaza de España. Qué chica más alegre y risueña. Y mi Marinita, mi segunda madre como decimos jaja, como echo de menos tu risa, tus tonterías, tu sentido del humor, y también tus platos cuando íbamos a tu casa. No le he dicho a nadie que teníamos un taller clandestino de muñequitos de fieltro y de Hamas Beads en tu casa (uups!), y lo bien que me lo pasaba haciéndolos. ¡¡Gracias por querernos a todos como si fuéramos tus niños, y por enseñarme a coser en fieltro!! Parece una tontería, pero algo de práctica cogí para después poder coser a los ratoncitos. Y a Andrés padre, nunca he visto una persona que tenga tantas sugerencias de películas series B en japonés (y en otros idiomas). Lo gracioso es que después terminábamos viéndolas y nos gustaban. Chicos, espero que nos veamos pronto, os echo de menos a todos, y sabéis que os quiero mucho. Gracias por estar ahí tantos años, espero que muchos más.

Ha habido tres personas muy importantes a lo largo de mi infancia, con las que ahora tengo menos contacto, porque la vida cambia mucho, pero que igualmente quería dedicar unas líneas, y son Álvaro, Susi y Jessy. Nos hemos criado juntos desde niños, nos conocemos desde que íbamos al colegio, recuerdo que me encantaba de niña cuando nuestros padres se juntaban para poder verlos y jugar a la playstation, tinieblas o lo que fuese... Cuando nos íbamos al pueblo todos, o cuando en verano nuestros padres quedaban en el parque Juan Carlos I. Nuestros cumpleaños en telericatorta y en el Telepizza, y después, aunque menos, hemos seguido manteniendo el contacto. ¡Quién me iba a decir que Susi y Jessy

ya tendrían bebés y serían madres! Os quiero mucho a los tres, aunque nos veamos menos, espero poder verlos de vez en cuando. Un beso a vosotros, a vuestros hijos y también a vuestros padres y hermanos.

Y bueno, qué es la infancia sin un pueblo. Aunque yo sea de Madrid, mi corazón siempre ha estado dividido entre Madrid y Extremadura, tierra de mi padre y mis abuelos. Menos mal que mis padres tuvieron la sabia decisión de comprarse una casita en un pueblecito muy pequeñito donde conocí a las tres mejores niñas que nadie podría conocer. Con las que pasaba todos los veranos, Semanas Santas y más recientemente, Las Fiestas del Pueblo. Y cuando no estábamos juntas, nos enviábamos cartas contándonos qué tal nos había ido en el colegio, con historietas y dibujos de Digimon (como nos gustaba), que todavía conservo. Irene, Andrea y Eva, hemos pasado tanto tiempo juntas y hemos pasado tantas cosas (buenas y malas, por desgracia) que podría dedicaros una tesis solo a vosotras 😊 Sois las mejores amigas que alguien podría tener, compañeras de risas, llantos, juegos, salseos, decisiones, consejos... Sabéis que estoy aquí para lo que necesitéis, porque yo sé que vosotras estáis ahí siempre, aunque estemos algún mes que otro sin vernos. A ver cuando pasa todo esto y volvemos a echarnos juntas unos bailes en las verbenas del pueblo. Irene y Andrea, mis gemelitas, aunque no seáis iguales, ya sabéis que os quiero mucho mucho, el vínculo que tenemos es muy especial y sabéis que me encanta lo alegres que sois las dos y lo reivindicativas que sois. Esos momentos donde nos juntamos en nuestras casas del pueblo a cenar todos juntos son inolvidables. Os adoro, lo sabéis. Un beso enorme para vosotras y vuestros padres. Evica, para mí siempre has sido como mi hermana pequeña, me encantaba cuando te adoptábamos los veranos de pequeña porque estabas todo el día en casa, siendo uno más de los Márquez. También recuerdo las tardes de verano en tu porche para ver a tus perritos, o cuando subíamos a la troje que se estaba fresquito, cuando éramos unos micos. Y mírate, ya eres una super veterinaria, y ahora ¡casi trabajas en lo mismo que yo! Qué mayor te has hecho. Te quiero mucho, mucho, un beso muy grande a ti, a tus padres y a tu hermana. Chicas, esta tesis también es un trocito de vosotras. ¡GRACIAS!

Después de ponerme nostálgica con mi infancia, me viene a la mente otra persona maravillosa que conozco desde hace mucho tiempo, desde mi adolescencia y que por suerte aún conservo. Una de esas personas que coincides en hobbies 100%, y que podría ser mi alma gemela en ese aspecto. Quién nos iba a decir que nos conoceríamos en clases de natación, y en los vestuarios empezamos a entablar conversaciones de animes, mangas, grupos de música emo y todas nuestras obras de arte que dibujábamos entre clases o en casa. Y así empezamos a tener amistad. Cuánto me alegro de haberte conocido por aquel entonces, Rocío. Sabes que siempre te he apoyado, he creído en ti y he querido muchísimo. Me encanta la emoción que le pones a tus dibujos, a tus historias, y con la que hablábamos de los animes que nos veíamos, porque así nos emocionábamos las dos más aún. Cuando íbamos a los expomangas juntas, la última en febrero del 2020, ¡como lo echo de menos! Menos mal que, aunque te fueras del barrio, seguimos manteniendo el contacto porque eres una de esas personas que no me gustaría perder en mi vida, por tu alegría y por tu forma de ser. Lo mejor de todo es que, aunque hayamos "crecido" y muchas personas pensaran que lo nuestro era algo pasajero, algo de niños, seguimos teniendo los mismos hobbies y no los hemos perdido. Y me alegra saber que hemos seguido el mismo camino tú y yo en ese aspecto. Así podremos seguir emocionándonos juntas con nuevos animes, personajes, y videojuegos. Cuanto me alegro de jugar juntas al Final Fantasy XIV, contigo y con Manu. Manu, a ti también te doy las gracias, por abrirme las puertas de tu casa, y por contar conmigo en el juego, en los expos y para los cines. Me encanta hablar contigo también de los animes que nos estamos viendo (tenemos una pendiente que ver, no se me olvida...) o de los videojuegos 😊 Así que, Rocío te doy las gracias de corazón, para mí tú eres un ejemplo de superación y de amistad de todas, todas, así que te dedico un trocito de esta tesis. Gracias a ti también he conocido a Irene, que no la conozco desde hace tanto tiempo como tú, pero sé que es una amiga en la que confiar 100%. Me encanta cuando quedamos las tres y nos ponemos al día de nuestras cosas. Aunque cuando habláis de lo que trabajáis y no me entere de nada, me alegra ver que os va tan bien. Y esos cumpleaños, los regalos que me habéis hecho siempre son maravillosos, qué bien me conocéis ya 😊 Irene, me ha encantado conocerte y esperemos que sigamos viéndonos las tres mucho más tiempo, gracias a ti también por preguntarme por mi trabajo y darme ánimos cuando quedamos. ¡¡Os quiero!!

Durante esta etapa de tesis, al poquito tiempo de entrar, me dio un momento de locura y me metí a jugar en un videojuego online. La verdad es que yo siempre he sido mucho de videojuegos, pero nunca había jugado a uno online, donde no le puedes dar a la pausa porque es a tiempo real y por lo tanto juegas con gente...real. Nunca pensé que iba a hacer piña con tantas personas de lugares de España tan diferentes... y de Argentina. La verdad es que habéis sido mi momento de escape de la realidad cuando quería olvidarme de todo y desde luego, para mi sois ya mi familia Dogma. Son bastantes los que han venido y se han ido, pero los férreos seguís ahí y os lo agradezco, porque quizás empezamos jugando juntos a un videojuego, pero hemos terminado hablando de la vida real, contándonos nuestras vidas, hablando de hobbies y apoyándonos mutuamente. Farron, el ahora desaparecido, ¡espero que vuelvas y volvamos a jugar juntos de nuevo que te echamos de menos! Gracias por los momentos de risas en el Final. Nathan o Nzn, que es más rápido para escribir en el chat, gracias por todos esos días de farreo de pollos, lobos y de mapas, y de cantar las mecánicas de los bosses cuando no teníamos ni idea de qué había que hacer. Me encanta hablar contigo por discord, que me recomiendes grupos de música y que los pongas en el bot mientras hablamos. Y los memes, que es de lo mejorcito que tengo de vosotros, los memes de Dogma jajaja Uni, me lo paso siempre superbién cuando juego contigo, me pareces muy divertido y aunque tus chistes sean muy muy malos, siempre me hacen mucha gracia (alguna vez que otra se me ha ocurrido algún chiste tipo "Uni"). Gracias también por los pokes, los memes y deja ya de poner el Papaya en la casa de la FC. Iko, ahora mismo no sé nada de ti, pero me ha encantado conocerte y jugar contigo en el juego y además haberte podido conocer aquella vez que fui a Bilbao y tomarnos una cerveza juntos. Espero que vuelvas a meterte al FF alguna vez y jugar por Eorzea de nuevo. Piglio, a ti te conozco menos, pero me ha encantado hacer la static contigo, aunque hayamos sufrido mucho en Shiva. No sigas el mismo camino de Rid de hacerme "bullin"...O te caerán cosas. Ahí queda jaja ¡Queen! Como me ha encantado conocerte, jugar contigo, y reírnos a carcajadas mientras jugábamos. Me encanta que seas una persona tan auténtica y transparente. Siento que tengo muchas cosas en común contigo y eso me encanta, al igual que podamos hablar de cualquier cosa de nuestra vida. ¡Ojalá te vea fuera del videojuego en algún momento! Así que gracias, Cuini. Lan, gracias por ser la cordura de Dogma, y por ayudarme en lo que fuera cuando te lo he pedido, como las nuevas raids del Nier por ejemplo, o ir a farmear cuando tú ya te sabías la batalla de memoria y decirme las mecánicas. O simplemente por decirte de hacer una expert y apuntarte. Me gusta mucho jugar contigo, y que me hayas contado cosas personales de ti, eso es porque confías en nosotros y me alegra mucho. Me gustaría conocerte en persona, aunque sé que eso es más difícil. De momento, sigamos jugando juntas mucho tiempo, porfi. Oven, mi argentino preferido. Qué alegría que me aceptaras en la FC de Dogma y formar parte de esta pequeña gran familia. Muchas gracias por jugar conmigo, ayudarme a mejorar con el summoner, querer raidear conmigo, aunque no lo hubiera hecho en la vida, y animarme a ello, porque la verdad es que lo disfruté mucho, aunque luego nos agobiáramos mucho con Shiva. Y ahora la verdad es que estoy deseando que vuelvas para poder ir a Ultima y volver a hacer raids con vosotros, que lo echo de menos. Así que vuelve de tu retiro espiritual, que tengo una FC que devolvete, que me hacen "bulli" por ser la jefa jajajajaja Gracias también por los memes, por hablar de animes y por las teorías de Shingeki. Por preguntarme qué tal y hablar de la vida en general, me ha gustado mucho conocerte online y ya sabes que me gustaría mucho conocerte en persona. Sabes que te tengo mucho, mucho cariño. Y, por último, pero no por ello menos importante, Rid. Gracias por ser mi compañero de aventuras por Eorzea desde el minuto 1 que coincidimos. Ahora mismo, el FFXIV no sería lo mismo si tú no estuvieras en él. Así que, gracias simplemente por estar ahí y ser mi compañero de experts, levelings, ruletas varias, farneos, raids, por ayudarme a mejorar en el juego en general. Por emocionarte cuando llegaban los domingos de Shingeki y ver los capis conmigo, por hacerme tanto de reír con tus ocurrencias (APLC?), por escucharme cuando he tenido problemas, y por contarme los tuyos y confiar en mí. Ya te he dicho que te agradezco mil que vinieras a verme a Holanda, cuando yo lo estaba pasando un poquito regu porque tenía a mi familia lejos, me ayudaste muchísimo con mi estancia allí y eso no lo voy a olvidar nunca. Tenemos aún un concierto pendiente en Barcelona, que espero que no vuelvan a posponer. Sabes que te tengo mucho cariño. Muchas gracias por todo, Rid.

Empecé estos agradecimientos hablando del TFG, y ya tocaba hablar del laboratorio tan maravilloso que empezó viéndome a crecer como investigadora, aunque aún me quedaba mucho camino por recorrer. Mi querido laboratorio de la Facultad de Medicina de la UAM, el C20, donde conocí a personas únicas. Primero agradecerle a Manolo la oportunidad que me dio de formar parte de esa pequeña gran familia que es el C20. Después a Víctor, que también nos enseñó muchísimo en la carrera y después en el labo, y que recuerdo que me preguntaba por mi padre cada vez que me veía después de aquella fatídica Semana Santa de 2014. Gracias por preocuparte por mi padre y por mí. Y ahora a mis compañeros de experimentos y células Jurkat. A Alba, por enseñarnos las técnicas y por ser tan extrovertida con nosotros. A Ana, me acuerdo de aquel día que nos invitaste a tu casa a Gonzalo, Andrea y a mí y nos pusimos orejas de gato, la foto sigue en Facebook. Andrea y Gonzalo, os quiero muchísimo. Me habéis enseñado muchísimas cosas, sobretodo tu Gonzalo, no tenía ni idea de usar un microscopio de fluorescencia ni de cuantificar, tú me lo enseñaste y eso no se me olvidará. Pero aparte de eso, eres una maravillosa persona y un gran científico. ¡¡No te rindas!! Andrea, juntas aprendimos las cosas del labo, me encanta tu forma de ser, espero que nunca se te vaya la sonrisa de la cara y esa felicidad tuya. Espero poder volver a verte en uno de tus conciertos, ¡que estás hecha una gran batería! A Jesús, ojalá hagamos más cenas de Navidad en el restaurante de tu padre. Me encanta cuando os juntais Gonzalo y tú y no parais de reiros. A Pablo, ¿te acuerdas de cuando te llamabamos Svenson? Recuerdo que Ana te lo escribió en la bata. Qué buenos momentos pasabamos en el labo. A Héctor, con ese pedazo de melena y tu gesto serio, que luego no era nada serio. A Sergio y David, que todavía no sé diferenciaros, y cuando viene el uno, el otro no viene... Sigo pensando que sois la misma persona jajaja. Miki, que hace mil que no te veo, pero espero que te vaya genial en el ejército. Con los demás he coincidido menos pero también os lo quería agradecer: Raúl, Alicia, Álvaro y Bianca. ¡Muchas gracias a todos!

Después de esta época del TFG me toca hablar de mi época del TFM y por ende, al laboratorio que me ha formado y en el que he pasado estos 6 años únicos donde he aprendido tanto. Primero quiero agradecerles a todos los que han pasado por el labo de nefro y se fueron, aquella vez cuando aún estábamos todos juntos y teníamos Nofu: Christian, Olga, Cristina, Valva, Tarín, Mel, Cristina G, Jonay, Alfonso, Cernest, Julio y Diego piscinas. Espero no olvidarme de ninguno, ¡que éramos muchos! Después, los que se fueron pero he tenido un poco más de contacto, como Olha, que hace mucho que no te veo, pero gracias por esos Congresos y cumpleaños juntas. Juanma, a ver si seguimos viéndonos para tomar algo. Juan, me encanta saber que hay jefes tan enrollados como tú, no se me olvidará nunca el congreso a Copenhague al que fuimos, me alegro mucho siempre de verte cuando vienes por la Fundación. Y ahora, los que sí que están por Nefro. Al labo de AO: Ana Sanz, Juan, Jorge, Susana, Diego, Zaza, Arancha, Adrián, Loli y Alberto. Al labo de CLJ: Carmen, Luis, Jose Luis, Nerea, Rafa, Lucía, Isa. Al labo de la -1: Sebas, Óscar, Cristina V, Carmen. De alguna forma u otra hemos compartido labo y momentos, eso es suficiente para agradecerlo. Ahora quería agradecerles a mis otros compis de labo y además compañeros de casas rurales. Estoy deseando que volvamos a hacer otra todos juntos. A las chicas de Carmen, Ana Melgar, Laura López, Luna, Susana y Gema. He pasado con vosotras muy buenos momentos, nos hemos ido de fiesta, hemos compartido juegos de mesa, (y Among Us también), nos hemos reído y nos hemos ayudado en el labo. ¡Sois un amor las cinco y os tengo un cariño muy especial! Me habría gustado mucho hacer ese viaje a Viena y Praga con vosotras, pero espero que una oportunidad parecida en el futuro se nos vuelva a presentar. ¡Gracias chicas! Después un poquito más tarde se incorporó al grupo de Carmen un chico un poco serio pero que luego descubrí el gran sentido del humor que tenía... ¡Nacho! Tenemos que volver a jugar al Among Us, echo de menos que seas el impostor y nos dejes encerrados en la parte del reactor jajaja ¡Gracias! A Fonti y Leti, que he compartido con vosotros muchísimos momentos, tanto en el labo como fuera. Me encanta vuestro espíritu emprendedor y aventurero que tenéis, además de que sois unos grandes compañeros, nunca habéis dudado en ayudarme cuando os lo he pedido. ¡Muchas gracias a los dos! A Gina (o Pocahontas 😊), que eres un amor de persona, te mereces todo lo bueno que te pase en la vida. Eres una luchadora nata. Gracias también por ayudarme cuando te lo he pedido. ¡¡Y a Raca!! ¡Gracias por ser mi compi todo este tiempo, me ha encantado compartir momentos contigo en el labo! Y que sigas visitándonos de cuando en cuando, aunque sea para usar la campana de células :P

AGRADECIMIENTOS

Creo que ahora me toca hablar de mis compis que no son del labo Nefro pero como si lo fueran. Gracias a Paula de Reuma y Arancha de inmuno, sois las dos unos amores. Juanpa, Isma y Emilio me ha sorprendido mucho para bien conoceros, me ha encantado siempre irme de cerves con vosotros, me río muchísimo cuando os juntáis con Antonio y no paráis de decir chorradas. Espero que vuelvan pronto los tiempos en que nos podamos juntar todos de manera normal. Los tres sois maravillosos, ¡muchas gracias por hacerme reír y por crear el mejor título de tesis que se podría tener! “moléculas curiosas y donde encontrarlas en el daño renal” Creo que no era así exactamente, pero algo parecido. Y a mi otro compañero que no es de labonefro, a Sergio, para mí eres una persona única, ¡menudo fichaje hizo inmuno contigo! 😊 Me encanta hablar contigo de Shingeki, o de cualquier cosa, cuando nos vamos de cerves porque me haces reír siempre y eso lo valoro muchísimo. Te tengo mucho cariño y lo sabes. ¡Gracias a todos!

Ahora me toca darle las gracias a la gente que de una forma u otra en este tiempo ha estado ahí, aunque no sea de labo nefro ni asociados. Me refiero a Marta, me ha encantado hacer tus inmunes, te hago las que quieras. Eres un amor. A Eva, gracias por enseñarme a hacer el UUO. A Curra, por su paciencia con el confocal. A la gente del animalario, a Juani y a Víctor por estar atentos de los ratoncitos y avisarnos, a Irene por ayudarme a pincharlos alguna que otra vez, a Carlos, por ayudarme con la burocracia y darnos conversación a la hora de estar en la sala de cirugías, y a Diego, por avisarme de las bajas de los ratones, de ofrecerte a pincharlos cuando no podía, y de cualquier cosa cuando te lo pedía. A Julia y Amelia, muchas gracias por entrar con una sonrisa al labo y hablar con nosotros. A Abel, a ponernos los desayunos y preguntarnos qué tal el día ¡Gracias!

Y no podía seguir agradeciéndole a compañeros sin pararme a dedicarle unas líneas a quien ha sido uno de mis pilares de por las mañanas cuando yo llegaba al laboratorio superzombi, y ¡qué mejor que empezar el día que con un buen café! Santi, muchas gracias por ser mi sonrisa de por las mañanas y el buen rollo que siempre has destilado, ¡que aguantarnos a 14 para pedirte cafés es muchísimo! Y aun así nos los ponías siempre perfectos 😊 Muchas gracias por tratarme siempre tan bien, por preguntarme como me iba, por darme ánimos y por prepararme esos cafés maravillosos. ¡Eres el mejor camarero de la FJD, y para mí, del mundo entero! Espero seguir mucho tiempo en el hospi y que seas tú el que me dedique una sonrisa y esos desayunos por la mañana 😊 Gracias de corazón, Santi.

No quería pasar de largo y no agradecerles a mis compañeros de labo de Holanda la ayuda que me ofrecieron cuando estuve por allí esos tres meses de estancia. First, thanks to Floris, for showing me all the lab as if I were part of it. And of course, I will never forget the day you invited me to Rotterdam, for me it was so wonderful going with you and Ana to discover your city! Thank you very much, Floris. It is really a pleasure to continue collaborating with you. Thanks to Roel G. Tri, and Lucas, you showed me your way of doing science and I really appreciate that you accepted me as if I were part of your group from the beginning. Roel B., I learned from you a lot about how you work there and I loved your jokes! Thank you for everything. And of course, Sebastiaan. Thank you for coming with me to have breakfast, for joining me to have lunch, for teaching me about microscopes, senescence and laugh together at anything. I am really delighted to have met you. Thanks, Sebaastian. Thank you all very much, for me you are my second lab! Y después de mi labo de Holanda, agradecerle a la persona que me acogió en su casa allí. Mi compañera de aventuras en Utrecht, Riwfka. Gracias por ser tan abierta conmigo desde el primer momento que llegué, menos mal que el destino o lo que fuera me llevó a conocerte y hospedarme en tu casa durante mis tres meses de estancia. Me ha encantado hacer viajes contigo a otras ciudades de Holanda, ver películas cuando nos aburríamos en tu casa, irnos de fiesta con tus amigos en el día del rey, o simplemente irnos a ver Lyse a su casa o que se viniera Maggie a la tuya, me ha encantado conocerlas también y que me hayan invitado a sus casas... Gracias también a ellas. Para mí este viaje de tres meses ha sido inolvidable y en parte es gracias a ti, Riwfka. Espero que nos volvamos a hacer juntas otro viaje como el que nos hicimos a Barcelona, ¡estoy deseando que esto termine e ir a verte a Utrecht, tengo muchísimas ganas! En cuanto pueda, ¡hazme un huequito en tu casa que voy! Gracias Riwfka.

Después de todas estas personitas maravillosas, creo que ya por fin me toca hablar de mi labo... Y a los que para mí siguen siendo de labo Marta, aunque se hayan ido. Javi, sé que te va a ir muy bien allí donde vayas, espero que hayas aprendido un poquito de nosotros. Maca, muchas gracias por ayudarme cuando te lo he pedido con cualquier cosa. ¡Eres una tía superluchadora y sé que te va a ir muy bien! A la hermana de uno de mis pilares en el labo... Raquel, tu ayuda para mí fue de las más necesarias en aquel momento, aprendí muchísimo contigo y me dio mucha pena que te fueras. Gracias, de verdad. Caro, muchas gracias por heredarme tu línea de investigación de Gremlin. Notch, y los KO de DLK1 porque, aunque haya costado sudor y lágrimas, hemos podido seguirla y terminarla, y eso es en parte gracias a ti. Me habría gustado mucho que tú hubieras sido mi mentora en estos 5 años, pero tenías que volverte a Chile... ¡Al menos pude aprender algo de ti en el tiempo que coincidimos! Espero que podamos seguir colaborando, aunque sea en la distancia. Muchas gracias por todo. Y bueno ahora toca a mi gran Morgui. Ya lo sabes, tú has sido mi chaleco salvavidas al poco de entrar en el laboratorio y menos mal que estuviste ahí para no hundirme. Eres una de las mejores personas que conozco tanto fuera, como dentro del laboratorio. Muchas gracias por ayudarme en el labo, por hablar conmigo de nuestros hobbies, por salir de fiesta y por las cerve, por todas las que nos hemos tomado juntos y nos seguiremos tomando, por las risas que nos hemos echado juntos y por escucharme cuando lo he necesitado. Espero que te vaya muy bien en la vida porque te lo mereces. Gracias con todo mi corazón.

Ahora creo que voy a hablar de los “asociados a grupo Marta” en modo figurativo porque en verdad o lo iban a ser o están tanto en nuestro laboratorio que como si lo fueran. Primero a Alberto, que coincidí con él en el máster y luego en el doctorado. Eres un tío supertrabajador y muy luchador, sé que te va a ir muy bien donde vayas. ¡Gracias por ayudarme cuando te lo he pedido! Al que me dio el apodo de “Marquesa de Hortaleza”. Lucas, ¡mi chileno preferido! Te voy a echar muchísimo de menos cuando te vuelvas a Chile, pero ya sabes que siempre he disfrutado de tu compañía porque eres especial, ¡una maravillosa persona y gran profesional! Muchas gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos en discotecas, casas rurales, congresos y, por supuesto, por todo lo que me has ayudado en el labo, ¡máquina! Espero que la vida me vuelva a cruzar contigo después de que te vayas. ¡Gracias Lucas! A mi Patri, que para mí eres de grupo Marta 100%, aunque ya no estés en el hospital. Eres una persona auténtica, bellísima y sabes que te adoro. Me alegro de que aún nos sigas visitando de cuando en cuando al labo. Gracias por todas esas sonrisas y momentos que hemos tenido juntas, te deseo lo mejor porque te lo mereces. ¡Gracias Patri! Y ahora toca a una personita muy especial que conozco desde que entré al labo y esa es mi Laruchi. Lara, sabes que te quiero muchísimo, y sabes que estoy aquí para lo que necesites. Quiero que sepas que para mí eres una de las mejores profesionales que conozco y una de las mejores personas. Muchas gracias por esos momentos de confidencia y por escucharme. Por las fiestas que hemos tenido juntas, los desayunos en la funda, las cerve, las casas rurales, los cumpleaños y los pijamas parties. Por estar en los buenos y en los malos momentos. ¡Muchas gracias por todo! Te adoro Laruchi.

Ya toca que hable de mis compis actuales de mi grupo, ¿no? Sandra, gracias por ayudarme en ese momento cuando ocurrió todo lo de Guille. Elena, gracias por todos esos chistes malos y risas en el laboratorio pre-pandemia. Me alegra mucho ver lo contenta que estás con tu preciosa niña 😊. A las nuevas incorporaciones, Laura e Irene, que las conozco un poco menos, pero sé que sois maravillosas las dos y estoy deseando compartir con vosotras muchas más tardes de cerve, momentos en el laboratorio, y enseñaros en lo que sea (Irene, prometo a enseñarte a hacer inmunes, lo tengo pendiente y no se me ha olvidado 😊). A Vane, porque siempre tienes una sonrisa en la cara (aunque ahora con la mascarilla no se vea) y eres de risa fácil. Me gusta mucho hablar contigo de animes, y salir contigo de cervezas. ¡Gracias!

Lucía, que pareces una persona más seria, pero luego eres de las más bromistas, ¡me encanta! Eres una niña encantadora y muy trabajadora, muchas gracias por ayudarme a sacar sin dudar el call de senescencia. Me encanta trabajar contigo y ver tu evolución como investigadora. Y por supuesto, quedar fuera del labo a comer y hacer teambuilding, ¡Espero que sean muchas más! ¡GRACIAS LUCI!

A mi Lau, aunque te hayas ido, para mí siempre vas a ser grupo Marta y vas a formar parte del labo. Cuanto me alegro de que Marta y Raúl te hicieran la entrevista y se decantaran por ti para ser nuestra compi. Congeniamos contigo desde el minuto 1, porque eres un sol de persona, una de las mejores que conozco. Solo tengo palabras bonitas para ti. Amable, dedicada, y una persona maravillosa de los pies a la cabeza. Además, eres una crack en tu trabajo, gracias por ayudarme tantísimo con los experimentos, aun cuando estabas que no dabas abasto entre la CUN y el labo. Gracias por ser mi amiga también y por todos los momentos fuera del labo. Se que te va a ir muy bien allá donde vayas. No te olvides de nosotros cuando vuelvas por Madrid, porque sabes que estamos siempre esperándote con los brazos abiertos. Te quiero muchísimo ¡MUCHAS GRACIAS LAU!

Antonio, en verdad pensaba ponerte en desagradecimientos, pero al final no iba a hacer un apartado solo para una persona... Así que te paso a agradecimientos 😊 Qué te voy a decir que no sepas ya, la verdad. Que te adoro y que agradezco muchísimo tenerte como compañero y como amigo. Me encantan tus bromas y tu risa, gracias por hacerme reír tanto, por los videos chorra que me enseñas, por la música en el labo, por las cervezas y comidas juntos. Y como no, agradecerte por todas las veces que me has echado una mano en el labo, sin dudarlo, que no han sido pocas. Por escucharme cuando estaba agobiada y necesitaba hablar con alguien. Eres un amor de persona, de verdad que te mereces todo lo bueno que te pase. Espero que estés cerquita de mi mucho tiempo porque eres una de esas personas a las que hay que tener cerca. ¡Te adoro! ¡GRACIAS ANTONIO!

Raúl, recuerdo que tu tesis fue la primera que vi, y aunque nunca pensé que tu fueras a ser mi co-director en aquel momento, ya vi lo bueno que eras en esto. Un poco después empecé a admirarte como profesional. Creo que no conozco a mejor investigador, por tu ética científica, por tu buen saber hacer. Como me alegro haberme juntado cada vez más a ti, aprender de ti y preguntarte cuando estaba desesperada con los experimentos, porque siempre sabías qué camino seguir. Y por supuesto, por todas tus bromas y risas cuando desayunamos y comemos juntos. Espero que esos momentos vuelvan a ser más poco a poco, porque te he echado mucho de menos en el post-confinamiento cuando estábamos en el labo y tu trabajando desde casa. Gracias también por invitarme a tu boda, porque me lo pasé pipa. Eres una gran persona, una de las mejores que conozco en la FJD, que no duda en ayudar a los demás. Muchas gracias por no dudar en ayudarme a mí también, y por aceptar ser mi codirector de tesis, para mí es una de las mejoras cosas que tiene. Te deseo todo lo mejor de este mundo. ¡MUCHAS GRACIAS RAÚL!

Y a Marta, tampoco tengo suficientes palabras de agradecimiento para ti. Porque si estoy en esta aventura es gracias a ti, porque me diste esta oportunidad que nunca pensé que tendría. Por aceptarme a hacer el TFM sin preguntarme la nota, como el resto de IPs. Aun así depositaste tu confianza en mí y me aceptaste para hacer el doctorado, proponiéndome la beca de la CAM. En ese momento me cambió la vida, empezó mi etapa laboral. Y cuanto agradezco que fueras tú mi primera guía en esta etapa. Porque eres una grandísima investigadora, conciliadora como nunca antes había visto. Y tan buena persona y tan cercana con nosotros. Esa es una de las cosas que más me gustan de ti, tu cercanía con las personas de tu grupo, que podemos hablar de cualquier cosa sin problema, por eso tu grupo de investigación es especial y diferente. Y por supuesto, qué bien me lo pasé contigo en la boda de Raúl, ojalá haya muchos más momentos así. He aprendido muchísimo de la investigación gracias a ti (de burocracias también), he aprendido a amarla y a querer hacer más. Gracias por enviarme a congresos, por darme líneas de investigación, por decirme de hacer una estancia fuera, porque seguramente si no me hubieras dado un empujoncito, yo probablemente no lo habría hecho. Gracias por ser tan buena guía, tan buena tutora y directora. Para mí ha sido un auténtico placer ser tu doctoranda. GRACIAS, GRACIAS y GRACIAS, MARTA.

Y para el final quería dejar a mi raíz, a mi familia, lo que para mí es lo más importante. Primero agradecer a los que ya no están, a mis cuatro abuelos: Petra y Paco, María y Aureliano, por darme a los mejores padres que nadie podría tener. Después a mis tíos, primero los que ya se han ido, Chicho, Alberto y Pedro. Pedro, te quería muchísimo, gracias por quererme tanto como sobrina. Y a los que están, Chelo y Emmita, hermanas de mi madre. Emmita, te quiero muchísimo, gracias por preocuparte de nosotras y querer vernos tan a menudo, me encanta que vengas a casa y celebremos todos nuestros cumpleaños juntas. A mis tíos

Carlos, hermano de mi padre, y mi tía Begoña. Me gusta muchísimo celebrar de un tiempo a esta parte los Reyes con vosotros, la parte del amigo invisible es lo mejor. También cuando nos juntamos todos en el pueblo, en la piscina o en casa. ¡Os quiero mucho! Gracias por estar ahí. Y gracias también a todos por darme a los primos tan maravillosos que tengo. Cintia, Tania, Karen, Ángel, Aroa, María, Juanma y Quique, aunque hace mucho tiempo que no os veo, os llevo a todos en el corazón. Sonia y Miguelito, aunque nos veamos menos ahora os quiero mucho y os tengo mucho cariño. A Rebe, muchas por las risas y los buenos momentos vividos juntas. Por los cafés con hielo en la piscina del pueblo en verano, por esas cervezas las dos en el bar del barrio de Begoña contándonos nuestra vida y escuchándonos. Los cumpleaños, los bailoteos del pueblo (donde habrán quedado, a ver si vuelven pronto). Esos pequeños momentos que adoro pasar contigo son los que más te agradezco, primi. Y Lucía, que eras una bebé, te he visto crecer y ya tienes 13 añazos, como pasa el tiempo. Os adoro a las dos, primis. Gracias. A mi primo Gonzalo, ¡mi referente en la vida en cuanto a videojuegos se refiere! Todavía me acuerdo cuando jugábamos juntos al Pokemon con la Game Boy Color, después pasamos a los Final Fantasy y a tantos otros... Y hoy en día, salir de la FJD e irme ahí al lado a tu casa simplemente para tomarnos algo y pasar el rato, lo disfruto muchísimo. ¡Paso muy buenos momentos contigo, primo, espero que sean muchos más! ¡Te quiero mogollón!

Y por fin ya voy a pasar a hablar de mi núcleo familiar, lo más importante para mí en esta vida. Y voy a empezar con mi Titi. Gracias a ti he aprendido a compartir, a amar y a cuidar, pues te he visto nacer y crecer. Me has enseñado muchas cosas en todo este tiempo, y cada vez aprendo más de ti. Mi hermana luchadora, reivindicativa, segura de sí misma. Sigo pensando que eres mi versión mejorada, aunque seas de letras... 😊 Gracias por contar conmigo para irme a tomar algo con tus amigos cuando sabías que estaba aburrida en casa y no tenía planes, o simplemente estaba agobiada y sabías que necesitaba salir. Me has dado conocer a personas tan guays como Alex, Dobo, Demon o Muras quienes también me han aceptado en su círculo sin dudarlo. Nos hemos ido de viaje juntas. Viniste a verme cuando estaba en Holanda, y pasamos unos días inolvidables por allí (nuestro próximo viaje es a Japón). Espero que hagamos muchísimos viajes más juntas. Me has apoyado siempre en todos los momentos malos que he tenido. Nos hemos reído juntas de todos los momentos buenos. Y como ya te dije, la vida sería muy aburrida sin ti. Todo esto es lo que hace que te quiera tanto, tanto. Desde luego yo sí que puedo presumir de tener una hermana como tú. Muchas gracias por quererme, y sobretodo, por ser mi hermana. Esta tesis va dedicada a ti. Te quiero.

Y a mis padres. Desde luego, de no ser por vosotros yo no podría estar donde estoy ahora mismo. El ejemplo máximo de la lucha, del trabajo duro, de que todo esfuerzo tiene su recompensa. Habéis trabajado incansablemente para que yo pudiera tener una formación superior y que estudiara lo que quisiera y me gustara. Gracias por vuestro apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida. Por educarme como me habéis educado, por atesorarme y quererme tanto. Vosotros sois mi modelo a seguir en esta vida. Papá, mamá, gracias por ser mis padres. Espero que estéis orgullosos de mí, porque para mí vosotros sois mi orgullo. Esta tesis os pertenece a vosotros. Os quiero.

LAURA.

Índice

INDICE

RESUMEN	29
SUMMARY	30
LISTA DE ABREVIATURAS	33
INTRODUCCIÓN	39
1. El riñón	39
2. Daño renal agudo	39
3. Enfermedad renal crónica	40
4. Bases moleculares y celulares del daño renal	41
4.1. El proceso inflamatorio en el daño renal	42
4.1.1 Vía de señalización de NF- κ B como eje de la inflamación renal	43
4.2. Fibrosis renal	45
4.3. Búsqueda de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas en el daño renal	46
5. Gremlin y la patología renal	47
6. Vía de señalización de NOTCH	49
6.1 Activación de la vía de señalización de NOTCH y sus funciones	51
6.2 Papel de la vía de señalización de NOTCH en el desarrollo embrionario y en las patologías renales	52
6.3 Papel de la vía de señalización de NOTCH en la inflamación: diferenciación de linfocitos T	54
7. Respuesta inmunológica Th17	55
7.1 Respuesta inmunológica Th17 en daño renal	58
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
Hipótesis	63
Objetivo general	63
Objetivos concretos	63
MATERIALES Y MÉTODOS	67
1. Modelos experimentales animales	67
1.1 Ratones con delección sistémica del gen <i>Dlk1</i>	67
1.2. Modelo experimental de Obstrucción Unilateral del Uréter	67
1.2.1 Modelo experimental de UUO en ratones modificados genéticamente de la cepa 129/SvJ	68
1.2.2 Modelo experimental de UUO con administración de DAPT en ratones de la cepa C57BL/6	69
2. Estudios proteicos	70
2.1. Técnica de Western blot	71
3. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos	72
3.1. Evaluación del tejido renal	72
3.2. Ensayos inmunohistoquímicos	72
4. Estudios de expresión génica	74
5. Análisis estadístico	75

RESULTADOS	79
1. Los niveles de expresión de <i>Dlk1</i> y <i>Dlk2</i> están aumentados en los riñones obstruidos de los ratones WT	79
2. La ausencia de <i>Dlk1</i> aumenta la presencia de células proinflamatorias en el riñón dañado por UUO, pero no induce cambios en la fibrosis	79
3. La delección de <i>Dlk1</i> modula el estado de algunos de los componentes de la vía de señalización de NOTCH	86
3.1 La expresión de <i>Dlk2</i> se encuentra aumentada en los riñones obstruidos en ausencia de <i>Dlk1</i>	86
3.2 La expresión de Jagged-1 incrementa en los riñones obstruidos, pero no se modifica en ausencia de <i>Dlk1</i>	87
3.3 La ausencia de <i>Dlk1</i> aumenta la activación de la vía de señalización de NOTCH1 en el riñón obstruido	88
3.4 La delección de <i>Dlk1</i> promueve la disminución de los niveles proteicos del receptor NOTCH2, pero no de NOTCH3 ni de NOTCH4 en los riñones dañados	91
3.5 La ausencia de <i>Dlk1</i> aumenta la expresión de <i>Hey-1</i> en los riñones dañados, pero no la de <i>Hes-1</i>	94
4. Estudios de mecanismos moleculares y celulares asociados al aumento de la inflamación renal en la ausencia de <i>Dlk1</i>	95
4.1 La delección de <i>Dlk1</i> no aumenta la activación de la vía clásica de señalización de NF- κ B en el daño renal	95
4.1.1 La ausencia de <i>Dlk1</i> incrementa los niveles de la citoquina proinflamatoria <i>Ccl-2</i> en los riñones sometidos a UUO a tiempos largos.....	96
4.2 La delección de <i>Dlk1</i> indujo un aumento del infiltrado renal de células liberadoras de IL-17A en los riñones obstruidos.....	98
5. La inhibición de la activación de la vía de señalización de NOTCH disminuye la respuesta inmunológica Th17	100
DISCUSIÓN	105
Activación de NOTCH1 y sobreexpresión de los ligandos no canónicos <i>Dlk1</i> y <i>Dlk2</i> en la patología renal experimental por UUO	105
Antagonismo de <i>DLK1</i> en el receptor de NOTCH1 en el daño renal	106
Expresión de los diferentes receptores de NOTCH en ausencia de <i>Dlk1</i> , y su relación con el daño renal	107
Papel de <i>Dlk1</i> en la regulación de las respuestas inflamatoria y fibrótica en el daño renal experimental por UUO	109
Respuesta inmune Th17 en el daño renal experimental por UUO en ausencia de <i>Dlk1</i>	111
Potenciales opciones terapéuticas en el daño renal: antagonistas e inhibidores de la vía de señalización de NOTCH e inhibición de la respuesta Th17	113
CONCLUSIONES	119
CONCLUSIONS	120
BIBLIOGRAFÍA.....	123
ANEXO.....	141

Resumen/Summary

RESUMEN

La vía de señalización de NOTCH se activa durante el desarrollo embrionario, aunque se encuentra silenciada en la etapa adulta. Durante diversos procesos patológicos, algunos de sus componentes se reexpresan y dan lugar a la activación de esta vía de señalización. En el daño renal se ha descrito la activación de la ruta de NOTCH1 y NOTCH3, asociados a aumento de expresión del ligando canónico Jagged-1, y varios componentes de esta ruta se han postulado como potenciales biomarcadores de daño renal. Sin embargo, hasta hoy, los ligandos no canónicos de esta vía han sido poco estudiados, siendo el ligando no canónico de NOTCH parecido a Delta 1 (DLK1) el más explorado debido a su papel clave para el desarrollo embrionario de multitud de órganos. A nivel molecular, se ha descrito que los ligandos no canónicos son capaces de unirse al receptor de NOTCH e inhibirlo, actuando como antagonistas competitivos en la señalización de la vía. Sin embargo, se desconoce si DLK1 puede actuar también como un antagonista de la vía de NOTCH en situaciones de daño renal.

El objetivo principal de esta tesis fue investigar la contribución del ligando no canónico DLK1 en el proceso patológico renal y los mecanismos moleculares subsecuentes. Para ello, se usaron ratones de la cepa 129/SvJ con una delección sistémica del gen del *Dlk1* los cuales fueron sometidos a una obstrucción unilateral del uréter (UUO) y los resultados fueron estudiados tras 2, 5, 10 y 14 días de obstrucción. En un primer lugar, el estudio en los ratones de la misma cepa no modificados genéticamente, reveló un aumento en la expresión génica de los ligandos no canónicos *Dlk1* y *Dlk2* a partir del quinto día del daño renal en los riñones obstruidos. La exploración de las lesiones renales, realizada por técnicas clásicas de histología, mostró un mayor aumento de infiltrado inflamatorio a partir de los 5 días tras la obstrucción en los ratones deficientes en *Dlk1*, destacando además la presencia de una infiltración perivascular hallada a los 14 días de obstrucción. Sin embargo, no se observó un mayor daño tubular o cambios en la acumulación de matriz extracelular (niveles de colágenos y presencia de células α -SMA positivas). La caracterización del infiltrado renal demostró una mayor infiltración de macrófagos F4/80+, neutrófilos, y linfocitos T CD3+ y CD4+ en los riñones dañados en ausencia de *Dlk1*. Por otra parte, en ausencia de *Dlk1* la vía de señalización de NOTCH1 se encontró sobreactivada también a los 14 días de obstrucción. Estos datos confirman que DLK1 es un antagonista de NOTCH en situaciones de daño renal. Además, otros componentes de la vía se encontraron modificados en los ratones deficientes en *Dlk1*, donde se observó una mayor expresión génica del ligando no canónico *Dlk2* y del efector *Hey-1* así como una disminución de la expresión proteica de NOTCH2. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión del ligando canónico Jagged-1, del efector *Hes-1*, ni de los receptores NOTCH3 y NOTCH4. Además, el estudio de la vía de señalización de NF- κ B no mostró cambios en su activación entre los genotipos estudiados, aunque sí se observó un aumento en la expresión de la quimioquina regulada por esta vía, el MCP-1 a los 10 y 14 días de obstrucción en los ratones deficientes en *Dlk1*. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que la respuesta inmune Th17 juega un papel fundamental en diferentes enfermedades renales crónicas, y que la quimioquina MCP-1 se encuentra asociada al aumento de la citoquina efectora de esta respuesta, la IL-17A. Por ello, se decidió estudiar los factores de transcripción implicados en la diferenciación de linfocitos Th17, ROR γ t y STAT3, así como la IL-17A. Todos ellos se encontraron sobreexpresados en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1* a los 14 días de obstrucción. Por último, se evaluó el efecto del bloqueo de la ruta de NOTCH en el daño renal experimental por UUO en ratones de la cepa C57BL/6 mediante en el tratamiento preventivo con un inhibidor de la γ -secretasa, el DAPT, la cual es esencial en la activación de la ruta de NOTCH, con el objetivo de estudiar si este bloqueo disminuía la respuesta inmunológica Th17 renal. Los resultados mostraron que la inhibición de la vía de señalización de NOTCH por DAPT disminuyó la respuesta inmune Th17 al disminuir la expresión de ROR γ t y de IL-17A en los riñones dañados. Teniendo en cuenta todos estos resultados se puede concluir que el DLK1 actúa como un inhibidor natural de esta vía y está asociado a la regulación de la respuesta inmune Th17 en la patología renal.

SUMMARY

NOTCH signaling pathway is highly conserved during evolution and it is activated in the embryonic development, in which all the NOTCH signaling pathway components play a role. Moreover, activation of NOTCH pathway has been also described in many pathological conditions, including kidney diseases. Currently, non-canonical NOTCH ligands have been scarcely studied. The most important one is the Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1 (DLK1), which plays a critical role in adipocyte differentiation and bone formation. The non-canonical ligands have been described to bind NOTCH receptor and inhibit the pathway activation, acting as competitive antagonists. However, the role of the non-canonical NOTCH ligand DLK1 in kidney pathologies is still unknown.

In the current study, the contribution of DLK1 in the kidney damage and downstream molecular mechanisms were explored. To this aim, genetic modified mice from 129/SvJ strain with a systemic deletion in *Dlk1* gene were subjected to unilateral ureteral obstruction (UUO) and the results were studied at 2, 5, 10 and 14 days after the obstruction. Firstly, the gene expression levels of the NOTCH non-canonical ligands *Dlk1* and *Dlk2* were upregulated in UUO-damage kidneys in wild type mice. The evaluation of morphological lesions comparing wild type and in *Dlk1*-deleted obstructed kidneys mice by Periodic acid-Schiff staining showed increased inflammatory cell infiltration, starting at five days following UUO, but there were no differences on tubular damage at any studied time. Moreover, no differences in renal extracellular matrix accumulation were observed between genotypes, confirmed by a Masson trichrome staining and an α -SMA immunohistochemistry. In obstructed kidneys from *Dlk1*-deleted mice an exacerbated perivascular infiltration was found at 14 days, enriched in F4/80+ macrophages, myeloperoxidase+ neutrophils and CD3+ and CD4+ lymphocytes. On the other hand, in *Dlk1* absence NOTCH1 signaling pathway was overactivated after 14 days of obstruction. In addition, renal gene expression of *Dlk2* and *Hey-1*, one of the NOTCH effector gene, were significantly increased in the absence of *Dlk1*. In contrast, no significant differences were found in the expression levels of the canonical ligand Jagged-1 and the gene effector *Hes-1* among genotypes. The study of the NF- κ B signaling pathway activation revealed no changes between genotypes. Moreover, among the NF- κ B-regulated proinflammatory genes only *Ccl-2* gene expression levels were significantly increased from day 10 until day 14 of UUO. The Th17 immune response plays a key role in the pathogenesis of experimental and human kidney diseases. Importantly, CCL-2/MCP-1 has been involved in IL-17A-mediated proinflammatory responses. Due to this, renal IL-17A levels and activation of the main transcription factors of the Th17 lymphocyte differentiation, ROR γ t and STAT3, were studied. All of them were found upregulated in the kidneys of *Dlk1*-deleted mice after 14 days of obstruction. Finally, the treatment with a γ -secretase inhibitor in the model of UUO performed in C57BL/6 mice blocked NOTCH pathway activation and diminished the Th17 immune response, determined by downregulation IL-17A and ROR γ t renal levels. These findings suggest that NOTCH pathway activation in the kidney is associated to Th17 immune response activation linked to renal inflammation.

In summary, we propose that the non-canonical NOTCH ligand DLK1 acts as an endogenous inhibitor of this pathway, modulating the Th17-related inflammatory response associated to kidney damage.

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

Debido a su uso común en la literatura científica, algunas de las abreviaturas se han mantenido en inglés, además de su significado, debido a la dificultad en la traducción.

ACT1: Activador de NF- κ B 1

ADAM: Una disintegrina y metaloproteasa

ANCA: Anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos

BMP: Proteínas morfogenéticas del hueso

BMPR: Receptor de las proteínas morfogenéticas de hueso

CCL: Ligando con motivo C-C

CCN2/CTGF: Factor de Red de Comunicación Celular 2/ Factor de crecimiento del tejido conjuntivo

CD: Clúster de diferenciación

CSL: *CBF1/Supressor of Hairless/LAG-1*

CXCL: Ligando con motivo C-X-C

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño

DAN: Gen aberrante en neuroblastoma seleccionado por screening diferencial

DAPT: *N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester [(2S)-N-[(3,5-Difluorofenil)acetil]-L-alanil-2-fenyl]glicina1,1-dimetilester]*

DLL: Ligando parecido a Delta

DLK: Ligando no canónico de NOTCH parecido a Delta (Del inglés *Delta Like Non-Canonical Notch Ligand*)

DNER: Receptor relacionado con el factor de crecimiento epidérmico parecido a Notch y Delta

DRA: Daño renal agudo

DSL: *Delta, Serrate y Lag-1*

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ERC: Enfermedad Renal Crónica

ERCT: Enfermedad Renal Crónica terminal

ERK: Quinasa Regulada por Señales Extracelulares

F3: Contactina 1

FA-1: Antígeno fetal-1

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HES: *Hairy and enhancer of split*

HEY/HERP: Proteína relacionada con HES

HRP: Peroxidasa de rábano picante

I κ B: inhibidor de NF- κ B

IKK: Quinasa de I κ B

IL: Interleuquina

IL-17RA/IL-17RC: Receptor de la interleuquina 17 A/C

JAK: Quinasas de Janus

JNK: quinasas c-Jun N-terminal

KIM-1: Molécula de daño renal-1

LCN2/NGAL: Lipocalina-2/ Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MCP-1: Proteína quimioatrayente de macrófagos-1

MEC: Matriz extracelular

MIP-1: Proteína inflamatoria de macrófagos-1

NB-3: Contactina 6

NECD: Dominio extracelular de NOTCH

NICD: Dominio intracelular de NOTCH

NIK: Quinasa inducida por NF- κ B

NF- κ B: Factor Nuclear-kappa B

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1

PAS: Ácido peryódico de Schiff

Pref-1: Factor de preadipocitos 1

RANTES: Regulado en la activación, expresado en T normal y secretado

RBP-J κ : Proteína J kappa de unión a la señal de recombinación

ROR γ t: Receptor huérfano gamma t relacionado con el receptor del ácido retinoico

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción

α -SMA: Alfa-actina de músculo liso

TACE: Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral

T β R: Receptor del factor de crecimiento transformante beta

TCR: Receptor de células T

TEM: Transición Epitelio-Mesénquima

TEndo-M: Transición Endotelio-Mesénquima

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

Th: *T helper*, Linfocito T cooperativo

TLR: Receptor parecido a Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral-alfa

TRAF: Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

TWEAK: Débil inductor de la apoptosis relacionado con TNF

UO: Obstrucción unilateral del uréter (del inglés, *unilateral ureteral obstruction*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial-vascular

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial-vascular

WT: de sus siglas en inglés *wild-type*, tipo salvaje o tipo silvestre

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. El riñón

En los animales vertebrados, el riñón está considerado como uno de los órganos más complejos y esenciales. Su principal función es filtrar la sangre y eliminar los elementos de desecho que se producen en el organismo debido al metabolismo celular. Además, los riñones participan en otra serie de funciones indispensables para el correcto funcionamiento del cuerpo como son la secreción, el metabolismo y la excreción de hormonas o la gluconeogénesis y la regulación de diversos procesos, incluidos la osmolaridad del líquido corporal y del equilibrio electrolítico, la presión arterial, y el equilibrio ácido-base. La capacidad de realizar todas estas funciones viene dada por la estructura y morfología de los riñones.

A nivel macroscópico, una sección transversal del riñón muestra una región más externa conocida como corteza renal y una región más interna denominada medula renal. Profundizando un poco más en la estructura renal, a nivel microscópico el riñón está compuesto por unidades estructurales y funcionales conocidas como nefronas. Las nefronas están constituidas por los glomérulos y por los túbulos proximales, distales y colectores. Los glomérulos son los encargados de filtrar la sangre y están formados por varios tipos celulares diferentes, entre los que encontramos las células mesangiales y destacan los podocitos, ya que son las células más importantes en los procesos de filtración. Los túbulos proximales y distales constan de las células tubuloepiteliales, polarizadas basolateralmente y especializadas en la reabsorción de agua y solutos.

De este modo, el papel que desempeñan los riñones en el mantenimiento funcional del organismo resulta esencial, por lo que cualquier daño que genere una alteración en la función de estos órganos puede originar complicaciones mayores que den lugar a la necesidad de terapias sustitutivas, como la diálisis (tanto hemodiálisis como diálisis peritoneal), o a la realización de un trasplante renal¹.

2. Daño renal agudo

Cualquier agresión en el riñón puede complicarse y generar un daño renal agudo (DRA), que se define como una pérdida acusada de la filtración glomerular que provoca una acumulación de los productos metabólicos de desecho, además de una imposibilidad de mantener el equilibrio ácido-base y la homeostasis de los electrolitos². De manera clínica, atendiendo a las actuales guías de práctica clínica para el DRA de KDIGO³ la enfermedad renal aguda se define teniendo en cuenta:

- Niveles de creatinina sérica mayor o igual a 0,3 mg/dl (26,5 μ mol/l) dentro de 48h o el aumento de la creatinina sérica mayor, o
- Niveles de creatinina sérica mayor o igual a 1,5 veces la línea basal, que haya ocurrido dentro de los 7 días anteriores; o
- Un volumen de orina menor a 0,5 ml/kg/h durante 6 horas.

El DRA se ha asociado con un aumento del riesgo a largo plazo de una deficiencia en la calidad de vida relacionada con la salud. Además, el DRA está relacionado con un aumento de las hospitalizaciones por mayor incidencia de infecciones, que conlleva a más ingresos en las unidades de cuidados intensivos y mayor mortalidad, lo que provoca un aumento en el coste sanitario⁴.

3. Enfermedad renal crónica

La ERC se caracteriza por la destrucción de forma progresiva de las nefronas, que en última instancia conducen a la ERC terminal (ECRT). Si el DRA no se resuelve adecuadamente puede progresar a ERC, proceso que se conoce como transición DRA a ERC⁵. Existe una relación entre DRA y ERC; los pacientes con ERC tienen mayor riesgo de sufrir un DRA, y episodios repetidos del DRA contribuyen a la progresión a ERC. Las causas de la ERC son diversas, incluidos alteraciones metabólicas, hemodinámicas, genéticas, entre ellas las más prevalentes son la hipertensión o la diabetes^{4,6}. Según las guías recientes de práctica clínica para la evaluación y gestión de la ERC de KDIGO^{7,8}, la ERC en el adulto se define como la presencia de una alteración estructural o funcional renal, o un filtrado glomerular (FG) inferior a 60 ml/min/1,73m² que persiste durante al menos 3 meses o más, con implicaciones para la salud. De este modo, la ERC se clasifica basada en la categoría del ratio del filtrado glomerular y de la albuminuria, el cual es un marcador de progresión en la ERC, y cuyo pronóstico se muestra en la **Figura 1**.

La ERC supone actualmente un grave problema global tanto a nivel individual como para los sistemas sanitarios de salud de los países ya que su prevalencia ha ido incrementando considerablemente durante las últimas décadas. Hay que remarcar que, incluso en las primeras fases de ERC, las personas ya presentan una morbilidad elevada derivada de problemas cardiovasculares asociados, así como una alta tasa de mortalidad total, lo que habla por sí solo de la severidad de esta patología⁹. Un estudio realizado en 2013 estimó que cerca de un millón de personas murieron durante ese año por ERC en todo el mundo, representando un aumento del 134.6% desde el año 1990¹⁰. Más recientemente, se determinó que la prevalencia de la ERC en el año 2017 a nivel global fue de aproximadamente 700 millones de casos, y la mortalidad de 1,2 millones. A estos datos, hay que sumar un incremento en la incidencia de la diálisis de un 43.1% y del trasplante renal en un 34,4%¹¹.

La prevalencia de la ERC en España ha crecido un 30% en la última década, situándose en 1284 pacientes por millón en 2017, frente a los 994 que había en 2008. Además, los nuevos casos se han incrementado hasta un 10%. En términos de mortalidad, se ha producido un aumento de un 30% (de 2006 a 2016) y se estima que, si continúa con esta progresión, la ERC

se convierta en la segunda causa de muerte en España. La última actualización a marzo del 2019, reportó que aproximadamente 7 millones de personas en España sufrían ERC y más de 60.000 requirieron de algún tipo de tratamiento de diálisis o trasplante renal¹².

Las previsiones globales para esta enfermedad tampoco son muy positivas teniendo en cuenta que se prevé que para el año 2040, la ERC será la quinta causa de muerte a nivel mundial, debido al notable aumento de los factores de riesgo que contribuyen a su aparición y progresión, como son la hipertensión, la diabetes, la obesidad y el envejecimiento, además de los propios factores de riesgo cardiovasculares¹³.

Filtrado glomerular Categorías, descripción y rango (ml/min/1,73 m ²) ^a			Albuminuria Categorías, descripción y rangos		
			A 1	A 2	A 3
			Normal a ligeramente aumentada	Moderadamente aumentada	Gravemente aumentada
			< 30 mg/g	30 - 300 mg/g	> 300 mg/g
G 1	Normal o elevado	≥ 90	42,9%	1,5%	0,1%
G 2	Ligeramente disminuido	60 - 89	42,0%	1,7%	0,0% (5)
G 3 a	Ligera a moderadamente disminuido	45 - 59	9,0%	0,9%	0,1%
G 3 b	Moderada a gravemente disminuido	30 - 44	1,1%	0,5%	0,1%
G 4	Gravemente disminuido	15 - 29	0,1%	0,1%	0,0% (4)
G 5	Fallo renal	< 15	0,0% (0)	0,0% (1)	0,0% (2)

Figura 1. Pronóstico de ERC basado en la tasa de filtración glomerular y la albuminuria, creado por las guías de práctica clínica de KDIGO y modificado por la Sociedad Española de Nefrología⁸. El mapa de colores representa: el verde cuando hay bajo riesgo; el amarillo cuando existe un riesgo moderado; el naranja con un alto riesgo y el rojo con un riesgo de sufrir muy alto de sufrir ERC.

Todos estos datos ponen de manifiesto la notable importancia que tiene la investigación, tanto clínica como básica, en el campo de las enfermedades renales.

4. Bases moleculares y celulares del daño renal

El epitelio tubular es metabólicamente muy activo y posee gran cantidad de mitocondrias lo que lo hace, por tanto, muy vulnerable al daño generado por hipoxia, compuestos tóxicos, proteinuria, desórdenes metabólicos y senescencia celular⁵. En respuesta a un daño, las células tubuloepiteliales experimentan diferentes cambios, entre los cuales se incluye la pérdida del contacto entre las células y el fenotipo epitelial polarizado que las caracteriza, lo que da lugar a una disfunción epitelial. El daño generado puede ser letal, que resulta en muerte celular, o subletal, que implica un cambio en el fenotipo epitelial, denominado transición epitelio-mesénquima (TEM) parcial, asociado a una liberación aberrante de mediadores proinflamatorios o profibróticos por parte de las células dañadas, lo que conduce a una pérdida progresiva de la función renal⁵.

El daño renal inicial cursa con una fase de regeneración caracterizada por la activación de mecanismos protectores y regenerativos en las células supervivientes cuyo objetivo es restaurar las propiedades y funciones del epitelio tubular⁵. Sin embargo, si estos mecanismos de regeneración fallan, se produce la progresión a ERC y fibrosis renal. Los mecanismos moleculares que participan en el daño tubular son muy complejos e involucran entre otros la disfunción mitocondrial, cambios metabólicos, estrés oxidativo, arresto del ciclo celular, desdiferenciación celular, secreción de mediadores inflamatorios, activación del sistema renina-angiotensina y cambios epigenéticos⁵. En función de la etiología, la magnitud y la propia duración del daño inicial pueden activarse mecanismos implicados en la muerte celular, que incluyen tanto la apoptosis como la necrosis regulada, donde se encuentran las vías de la ferroptosis, piroptosis y necroptosis¹⁴. Estas vías de necrosis regulada, a diferencia de la vía clásica de apoptosis, desencadenan la secreción celular de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) que son altamente proinflamatorios, lo que conduce a la creación de un ciclo de muerte-inflamación, denominado necroinflamación, que acentúa la progresión del daño renal por el reclutamiento de células infiltrantes¹⁵.

4.1. El proceso inflamatorio en el daño renal

La respuesta inflamatoria que se produce cuando el tejido sufre un daño es un proceso complejo que depende de gran cantidad de estímulos y señales que favorecen la migración y diapédesis de células infiltrantes desde los vasos hasta el tejido renal^{16,17}. Entre estas células se encuentran las del sistema inmunológico innato, como son los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas, y los mastocitos que son las primeras células reclutadas y que provocan una respuesta rápida ya que reconocen los DAMPs liberados¹⁸. Por otra parte, también se reclutan las células del sistema inmunológico adaptativo, que reconocen los antígenos extraños presentados por las células dendríticas, y que se agrupan en los linfocitos B y los linfocitos TCD3+, que se dividen a su vez en dos grandes subgrupos, los linfocitos TCD4+ también denominados linfocitos T cooperadores (Th, de sus siglas en inglés *T helper*) y los linfocitos TCD8+ denominados linfocitos T citotóxicos^{19,20}. Además del objetivo principal de estas células infiltrantes inflamatorias, actuar respondiendo contra una infección extraña al organismo, todas ellas también tienen como objetivo contribuir a la reparación y regeneración del daño renal en la fase aguda²¹⁻²³. Sin embargo, en la ERC la respuesta inmunitaria inflamatoria se encuentra activada de manera persistente, lo que provoca una sobreproducción de citoquinas y factores profibróticos, por lo que en este caso las células inmunológicas infiltrantes juegan un papel deletéreo contribuyendo a la progresión de la enfermedad, la pérdida de nefronas y la fibrosis^{20,24}. Además de estas células infiltrantes, las células glomerulares y tubulares del riñón activadas por el daño son capaces también de producir y liberar citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, tales como la interleuquina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), el inductor débil de la apoptosis relacionado con TNF (TWEAK), la proteína quimioatrayente de monocitos-1, (CCL-2/MCP-1), el ligando 5 con motivo C-C (CCL-5/RANTES), El ligando con motivo C-X-C 10 (CXCL10) entre otras, que activan diferentes mecanismos de inflamación en las células

circundantes^{16,17}. Entre los diversos mecanismos celulares que existen, dos de las más relevantes y estudiadas son las vías de señalización del factor nuclear-kappa B (NF- κ B), así como la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)^{25–28}.

4.1.1 Vía de señalización de NF- κ B como eje de la inflamación renal

El estudio de la vía de señalización de NF- κ B ha sido muy amplio, ya que es el mecanismo principal de la activación de los procesos inflamatorios celulares, no solo en el riñón, si no en todos los tejidos²⁹. Esta compleja vía de señalización se activa por diferentes estímulos y ligandos, de los cuales los más estudiados son el TNF- α , la IL-1 β y los receptores parecidos a Toll (TLRs). La unión de los ligandos con sus correspondientes receptores produce una cascada de activación de señales intracelulares donde la IKK (quinasa de I κ B) fosforila a la proteína inhibidora de NF- κ B (I κ B), lo que conlleva a su posterior degradación. Esto produce la liberación del complejo de proteínas p50/p65, el cual es fosforilado por IKK y translocado al núcleo celular. Una vez en el núcleo, la unión de este complejo a los promotores de los genes diana produce la transcripción de multitud de genes relacionados con los procesos de inflamación, como pueden ser las quimioquinas y citoquinas (**Figura 2**). Este proceso es conocido como la vía de señalización clásica o canónica del NF- κ B y se trata de una vía de activación rápida a corto plazo³⁰. Sin embargo, a lo largo de los años, el estudio en profundidad de esta vía ha dado lugar al descubrimiento de una vía alternativa, denominada como no canónica, e incluso de otros mecanismos híbridos de ambas vías, haciendo que la comprensión de la señalización de la vía sea aún más compleja³⁰.

A diferencia de la vía canónica, la vía no canónica de NF- κ B no está activada por TNF- α , si no que precisa de otros ligandos para su activación, como pueden ser TWEAK o el ligando de CD40, y además requiere de una activación más prolongada en el tiempo^{30,31}. El mecanismo de señalización en este caso implica que la unión de determinados ligandos a su correspondiente receptor active a la quinasa inducida por NF- κ B (NIK), que a su vez fosforila y activa a IKK α , la cual posteriormente fosforila la proteína p100, lo que desencadena su degradación parcial dando lugar a otra proteína denominada p52. Una vez constituida, p52 se une a RelB para formar un complejo que se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción de los genes diana de la vía alternativa, como son las citoquinas CCL-19 y CCL-21³¹ (**Figura 2**).

En patologías renales experimentales y humanas, como la nefropatía diabética, nefropatía membranosa, la glomerulonefritis por IgA, la glomerulonefritis crescente y la nefritis lúpica se ha descrito la activación de la vía canónica de NF- κ B^{32–36}. En lo que respecta a la vía alternativa de activación de NF- κ B, se ha descrito su participación en la nefropatía diabética en humanos³⁷, en células circulantes de pacientes con enfermedad renal terminal en hemodiálisis, así como en el daño renal experimental agudo y en células renales en cultivo^{38,39}.

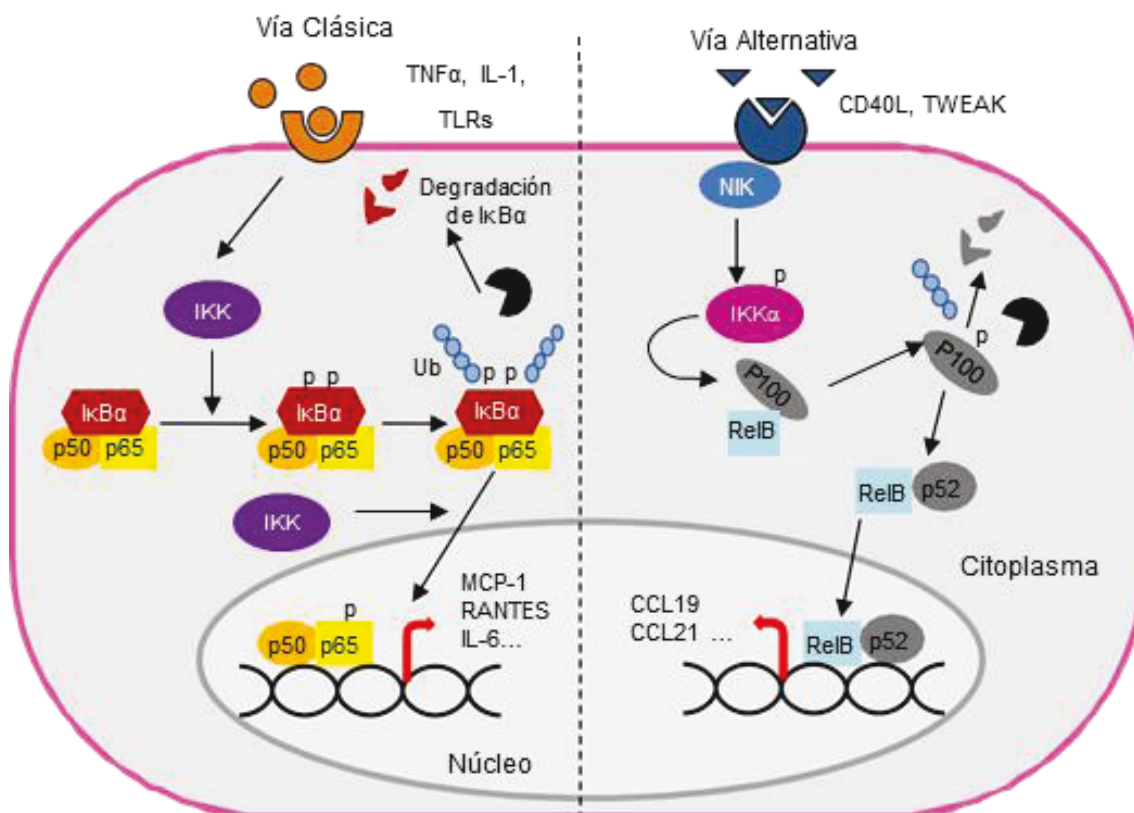


Figura 2. Vía de señalización clásica y alternativa de NF- κ B. Modificado de (40).

La importancia de la activación de la vía NF- κ B en el daño renal ha dado lugar a diversos estudios experimentales encaminados a buscar inhibidores farmacológicos que puedan ser utilizados para atenuar la respuesta inflamatoria exagerada modulada por esta vía⁴¹. En estudios iniciales dos de estos inhibidores, el partenolide y la gliotoxina mostraron efectos beneficiosos tanto en células renales en cultivo como en un modelo de glomerulonefritis en ratas, en los cuales disminuyeron el ambiente proinflamatorio^{42,43}. Recientemente, en un modelo de nefropatía diabética de tipo II (db/db) en ratones el partenolide redujo la inflamación renal, la vía de señalización de la insulina y la recaptación tubular de la albúmina⁴⁴. Por otra parte, también se ha estudiado de manera experimental la modulación de la vía de señalización no canónica de NF- κ B en diferentes modelos de daño renal, donde el bloqueo específico por el inhibidor farmacológico SN52 de la translocación nuclear de p52/RelB redujo la inflamación renal y la reexpresión de los genes proinflamatorios *Ccl-19* y *Ccl-21*³⁹.

A pesar de los datos preclínicos existentes, a día de hoy, no existen ensayos clínicos en humanos con el partenolide en el campo de las enfermedades renales, solo en el campo de la dermatitis (NCT00133341, NCT00640614), y actualmente no existe ningún inhibidor farmacológico de la vía de la vía alternativa de NF- κ B que se esté usando en ensayos clínicos.

4.2. Fibrosis renal

La fibrosis es un proceso que cursa con acumulación de matriz extracelular (MEC), sobre todo de colágenos, que sustituyen a las células muertas y que genera un proceso de cicatrización en lugar de una regeneración celular. Aunque se trata de un proceso fisiológico de reparación de daño, al igual que ocurre con la inflamación, puede convertirse en un proceso patológico cuando se produce de manera descontrolada⁴⁵. Además, en situaciones patológicas, otros mecanismos fisiológicos encargados de la degradación de la matriz se inhiben al mismo tiempo que se incrementa la producción de componentes de MEC⁴⁵. Todos estos mecanismos promueven una fibrosis exacerbada del órgano que termina en una disfunción de este⁴⁵. Este proceso puede ocurrir en todos los tejidos, lo que puede dar lugar a enfermedades conocidas como cirrosis, en el caso del hígado, escleroderma en la piel o fibrosis del miocardio. En el riñón, se pueden diferenciar dos tipos de fibrosis atendiendo a la localización del acúmulo de MEC: la fibrosis tubulointersticial y la glomeruloesclerosis^{45,46}.

En el daño glomerular progresivo, el proceso fibrótico está asociado a un incremento de muerte de podocitos y de la secreción de componentes de MEC dentro del glomérulo, proceso conocido como glomeruloesclerosis⁴⁷. Todas las patologías renales crónicas, incluidas las de origen glomerular, se caracterizan por fibrosis tubulointersticial. De esta manera, la extensión del área fibrótica en el intersticio es un parámetro clínico altamente utilizado para definir el grado de daño glomerular y la disminución progresiva de la función renal⁴⁶. En las patologías tubulointersticiales el fallo de los procesos de regeneración en las fases iniciales del daño renal agudo promueven la transición del DRA a ERC de manera progresiva^{5,48,49}.

Las principales células productoras de MEC son los fibroblastos, células mesenquimales que juegan un papel esencial manteniendo la arquitectura del órgano, ya que regulan la composición de la MEC y su homeostasis⁵⁰. En condiciones patológicas los fibroblastos se activan transformándose en miofibroblastos que contribuyen a la acumulación excesiva de MEC en los tejidos, principalmente colágenos, desencadenando la fibrosis⁵¹. El origen de los miofibroblastos en los procesos de fibrosis varía entre los tejidos y las condiciones patológicas, e incluyen a los fibroblastos residentes, y otros tipos celulares, como son los pericitos, las células derivadas de la médula ósea, los fibrocitos, las células epiteliales o las endoteliales^{52,53}. A diferencia de otros tejidos, la presencia de los fibroblastos en la corteza renal es prácticamente residual y se localiza en el intersticio de los riñones sanos^{50,54}. Sin embargo, en condiciones patológicas estos fibroblastos residentes se activan y se transdiferencian a miofibroblastos. Múltiples estudios han investigado el origen de los miofibroblastos en la fibrosis renal, siendo aun un tema controvertido, en parte por la falta de marcadores específicos⁵. Los fibrocitos son células derivadas de la médula ósea productores de colágeno y su relevancia como precursores de los miofibroblastos en la fibrosis renal ha sido ampliamente estudiada⁵⁵. Otra fuente de miofibroblastos son los pericitos, una extensa población de células mesenquimales que se encuentran adheridas a los capilares peritubulares o fibroblastos residentes cuando se encuentran presentes en la MEC⁵⁶. Además de estos precursores, las propias células tubuloepiteliales y endoteliales se han postulado como

precursores de los miofibroblastos cuando se transforman a través del proceso de TEM o transición endotelio-mesénquima (TEndo-M), respectivamente⁵⁷⁻⁵⁹. En el riñón, el proceso de TEM parcial de las células tubuloepiteliales provoca la pérdida de polarización y funcionalidad, y, aunque la contribución de la TEM al aumento de miofibroblastos en el riñón fibrótico es un tema todavía controvertido, este cambio de fenotipo se asocia a un secretoma aberrante que se compone principalmente de citoquinas proinflamatorias y profibróticas, que contribuye de forma directa a la progresión del daño renal y de la fibrosis^{5,53}.

Dentro de los factores que participan en el inicio y la progresión del proceso fibrótico, TGF- β está considerado como uno de los mediadores más importantes^{60,61}, ya que es capaz de activar a las células residentes de los órganos para liberar MEC al medio. El mecanismo de activación de la ruta de TGF- β se inicia mediante su unión con el receptor tipo II (T β RII) y la subsecuente activación del receptor tipo I (T β RI). Una vez activado, T β RI fosforila y activa diversas vías, dentro de las cuales la vía de señalización intracelular de las Smads (Smad2 y Smad3) la más común. Una vez activado, el complejo Smad2/3 se une a Smad4 y se translocan al núcleo donde regula la expresión de sus genes diana, como son mediadores proinflamatorios, profibróticos y de MEC⁶².

A pesar de que TGF- β ha sido considerada como una potencial diana terapéutica y de que varios estudios preclínicos avalan el efecto antifibrótico de la supresión de la vía de señalización de este factor, se ha demostrado que su inhibición cursa con efectos secundarios tanto en el sistema cardiovascular como en el riñón. Estos efectos son debidos a que, aparte de ser un factor profibrótico, TGF- β participa en otros mecanismos homeostáticos esenciales⁵, lo que hace necesaria la búsqueda de otras dianas terapéuticas que puedan utilizarse para prevenir/detener el proceso fibrótico.

4.3 Búsqueda de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas en el daño renal

A pesar de que los resultados obtenidos con los inhibidores de la activación de NF- κ B para disminuir la inflamación, y los de la vía de señalización del TGF- β para frenar la fibrosis no hayan continuado en ensayos clínicos o se hayan paralizado debido a los efectos secundarios, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores que permitan prevenir o detener el daño renal sigue siendo uno de los retos más importantes para la comunidad científica. Actualmente, dentro de los candidatos más prometedores se encuentran algunos factores relacionados de una u otra manera con la vía de señalización del NF- κ B y con la superfamilia del TGF- β , como son Gremlin, la vía de señalización de NOTCH o la respuesta inmunológica Th17, mediada por su citoquina IL-17A.

5. Gremlin y la patología renal

Gremlin es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución, que posee tanto una forma anclada en la membrana como una soluble que se libera al medio, y que pertenece a la familia de las proteínas DAN/Cerberus, antagonistas naturales de las proteínas morfogénicas del hueso (BMP)^{63,64}. Todas estas proteínas forman parte de la superfamilia del TGF- β ⁶⁵ y, además, están involucradas en procesos tan importantes como la generación de las extremidades y el desarrollo de órganos, incluido el riñón⁶⁶. Gremlin se ha descrito como un factor esencial en el desarrollo embrionario, ya que la mutación del gen *Grem-1* en ratón produce malformaciones en la digitalización y la formación aberrante de las extremidades⁶⁷. Sin embargo, en estado adulto la expresión de este gen se encuentra prácticamente inhibida salvo en determinadas condiciones patológicas, incluidas algunas enfermedades renales⁶⁸. El aumento de expresión de *Grem-1* fue descrito por primera vez en el riñón diabético en un modelo de nefropatía diabética experimental inducido por la administración de estreptozotocina en ratas así como en células mesangiales humanas estimuladas con altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo⁶⁸.

Gremlin puede actuar como un antagonista de los ligandos BMP, como se ha demostrado en el desarrollo embrionario y en procesos fibróticos⁶⁹. La vía canónica de activación inducida por las BMP involucra la activación del receptor tipo II (BMPRII) el cual fosforila y activa al receptor tipo I (BMPRI). La unión de ambos homodímeros conduce a una cascada de fosforilación y activación de las Smads, proceso muy similar al observado en la vía de señalización de TGF- β ⁶⁴. En este caso, son las Smads1/5/8 las que se fosforilan y se asocian con Smad4, formando un complejo que se transloca al núcleo y activa la expresión de los genes efectores, como la Smad6⁶⁴. El mecanismo mediante el cual Gremlin actúa como antagonista de esta vía es uniéndose de manera directa con las BMP e impidiendo, por tanto, la activación del receptor y de la señalización de la vía⁶⁴.

A nivel experimental, utilizando un ratón transgénico que sobreexpresa *GREM-1* humano específicamente en los túbulos renales se ha observado una mayor predisposición al daño renal agudo inducido por administración de ácido fólico y al daño diabético inducido por administración de estreptozotocina, todo ello mediado por la expresión de factores proinflamatorios y profibróticos^{70,71}. Además, en pacientes con nefropatía diabética se encontró una correlación positiva entre los niveles de expresión de Gremlin y los niveles de fibrosis tubulointersticial⁷². Cabe destacar que Gremlin se ha encontrado expresado en las crescentes glomerulares que se producen en las glomerulonefritis humanas⁷² y, más recientemente se ha sugerido también como un nuevo marcador urinario en la vasculitis renal asociada a ANCA⁷³.

A nivel molecular, se ha descrito que Gremlin juega un papel importante en la fibrosis renal. En células renales en cultivo, Gremlin aumenta la producción de mediadores profibróticos como TGF- β , el factor de red de comunicación celular 2 (CCN2, también denominado factor de crecimiento del tejido conjuntivo, CTGF), y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)^{69,74}. Además, en fibroblastos renales aumenta la producción de componentes de MEC como

fibronectina y colágeno, e induce la TEM parcial de las células tubuloepteliales renales hacia un fenotipo caracterizado por la expresión de la alfa-actina de músculo liso (α -SMA) y la pérdida de E-cadherina, proceso mediado por la activación de la vía de las Smads⁷⁵. Un dato importante a tener en cuenta es el descubrimiento de un ciclo de regulación positivo entre TGF- β y Gremlin en células renales en cultivo, lo que conlleva a una activación rápida de la vía de las Smad por Gremlin la cual es posteriormente mantenida en el tiempo por la activación de la ruta de TGF- β ⁷⁴⁻⁷⁶ (**Figura 3**).

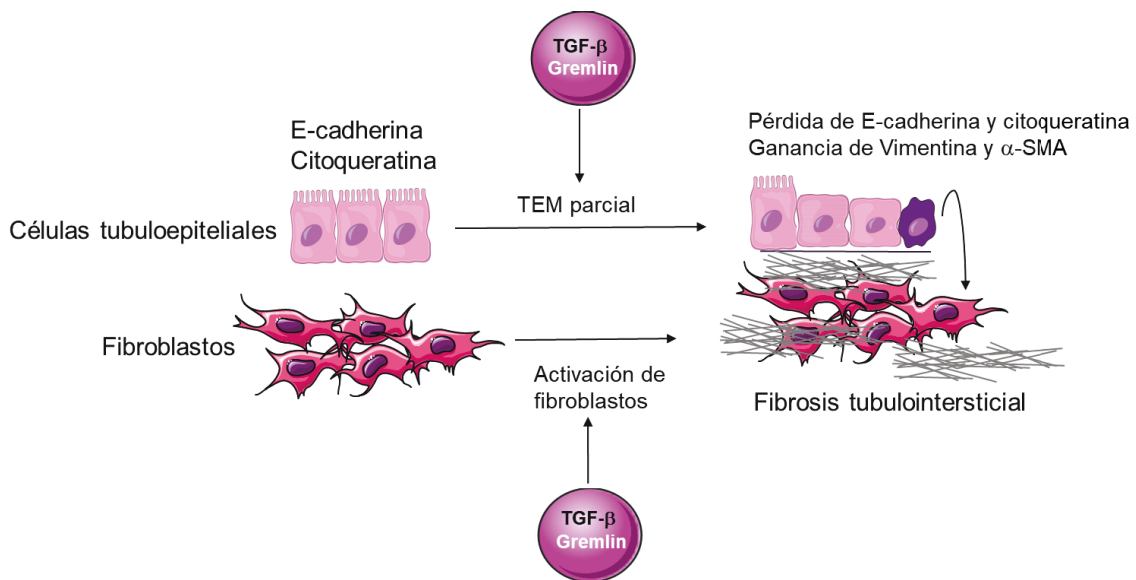


Figura 3. Acciones de TGF- β y Gremlin en la fibrosis renal. Modificado de (76).

En el año 2010 tuvo lugar un descubrimiento importante para profundizar en el conocimiento Gremlin, el cual consistió en la detección de una unión entre Gremlin y el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGFR2) mediante la técnica de plasmón superficial y en células endoteliales, donde Gremlin produce efectos parecidos al ligando canónico de este receptor, el VEGF-A, incluida la angiogénesis y la migración celular⁷⁷. De este modo, se expandía la visión de Gremlin como un antagonista de las BMP, otorgándole la capacidad de ejercer funciones BMP-independientes a través del VEGFR2⁷⁷. Posteriormente, se describió que Gremlin también se unía al VEGFR2 en células tubuloepteliales en cultivo y se demostró que tanto el uso de un inhibidor de la quinasa del VEGFR2, el SU5416, como el silenciamiento génico de dicho receptor, eran capaces de disminuir los efectos mediados por Gremlin en estas células⁷⁸. Además, estos resultados se confirmaron también *in vivo* en un modelo experimental que consistía en la inyección de Gremlin en el parénquima renal, en el que se observó una colocalización de Gremlin con el VEGFR2 fosforilado en las células tubuloepteliales proximales, sugiriendo que VEGFR2 es un receptor funcional de Gremlin en el riñón. En un estudio de secuenciación de RNA en este modelo de administración de Gremlin se observó que entre los genes más aumentados se encontraban dos de los biomarcadores clásicos que aumentan en el riñón respuesta a una agresión, la Lipocalina-2 (*Lcn-2*), que da lugar a la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), así como el gen que da lugar a la molécula de daño renal 1

(KIM-1)⁷⁹. De forma similar, en el modelo experimental de obstrucción unilateral del uréter (UUO, de sus siglas en inglés *unilateral ureteral obstruction*), se detectó una sobreexpresión de Gremlin asociada a una activación de la vía de señalización de NF- κ B y con un incremento en la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias. Toda esta activación se revertía al usar el inhibidor de la quinasa del VEGFR2⁷⁸. Del mismo modo, en biopsias de pacientes con enfermedad renal, se observó la colocalización de Gremlin y VEGFR2 fosforilado, principalmente en células tubuloepteliales, demostrando la activación de la ruta Gremlin/VEGFR2 en patologías renales⁷⁸.

6. Vía de señalización de NOTCH

La vía de señalización de NOTCH, fue descrita en un primer lugar en *Drosophila Melanogaster*, aunque posteriormente se demostró también su presencia en nematodos y vertebrados. Se trata de una vía altamente conservada durante la evolución y se ha demostrado que juega un papel esencial tanto en el desarrollo embrionario de múltiples tejidos como en la homeostasis en de los tejidos adultos^{80,81}.

La vía de señalización de NOTCH en mamíferos se compone de varios ligandos canónicos, de ligandos no canónicos, de receptores y de sus correspondientes proteínas efectoras. Los receptores y los ligandos son proteínas transmembrana que pertenecen a la familia de proteínas parecidas al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Entre los ligandos canónicos se encuentran Jagged-1, Jagged-2 y los ligandos parecidos a Delta (DLL): DLL-1, DLL-3 y DLL-4; mientras que entre los ligandos no canónicos aparecen el receptor relacionado con el factor de crecimiento epidérmico parecido a NOTCH y Delta (DNER), F3/Contactina1, NB-3/contactina6, y los Ligandos no canónicos de NOTCH parecidos a Delta 1 y 2 (DLK1 y DLK2)^{82,83}.

Los ligandos canónicos de NOTCH se caracterizan por tener un dominio Delta-Serrate-Lag1 (DSL) situados en la parte extracelular en el dominio amino-terminal, el cual es esencial para las interacciones del ligando con el receptor. Además, esta parte extracelular posee varias repeticiones tipo EGF, al igual que sucede en el receptor. De manera diferencial, los ligandos Jagged poseen además un dominio rico en cisteínas que no poseen los ligandos DLL, pero se ha descrito que estos últimos también son capaces de unirse al receptor sin este dominio^{84,85}. Jagged-1 es el ligando canónico de la vía de señalización de NOTCH por excelencia y posiblemente el más estudiado⁸⁶.

Por otro lado, los ligandos no canónicos, caracterizados por carecer del dominio DSL de unión al receptor, forman parte de una gran familia de ligandos que se clasifican en tres subtipos: los anclados a membrana, como son DLK1, DLK2 [también denominado EGF ligando 9 (EGFL9)], DNER y Jedi; los anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI) como F3/contactina1 o NB-3/contactina6 o incluso solubles, como OSM11 y EGFL7, cuyas funciones con respecto al receptor de NOTCH en muchos de ellos son aún desconocidas^{82,83,87}. El ligando no canónico más estudiado es DLK1, también conocido como Factor de preadipocitos 1 (Pref-1). Se trata de un ligando que puede encontrarse tanto anclado a la membrana como de forma soluble

[denominado en este caso como antígeno fetal-1 (FA-1)], ya que puede ser procesado por las metaloproteasas/disintegrinas (ADAMs)⁸⁸. Tanto DLK1 como DLK2 son capaces de unirse al receptor de NOTCH, a través de las repeticiones tipo EGF que poseen^{89,90} (**Figura 4**). Además, son capaces de inhibir su activación de manera competitiva y, por tanto, la señalización de la vía^{91,92}. Un dato importante a tener en cuenta es que diversas investigaciones han determinado que las interacciones entre DLK1 y NOTCH son en *cis*, es decir, la inhibición de DLK1 en la señalización de NOTCH ocurre cuando tanto el ligando como el receptor están expresados en la misma célula. Este suceso ya se ha descrito en el caso de otros ligandos. Normalmente, los ligandos activadores de la vía de señalización actúan cuando se expresan en una célula adyacente a la célula en la que se encuentra el receptor (en *trans*) pero actúan como inhibidores cuando se expresan en la misma que el receptor (en *cis*)^{82,89,93,94}. No obstante, existen algunos artículos donde se describe la capacidad del ligando DLL4 liberado en exosomas y microvesículas de inhibir la señalización de NOTCH de manera yuxtacrina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Este mecanismo sería similar al descrito en cáncer, aunque aún se necesitan nuevos estudios para determinar estos efectos *cis* y *trans* de los ligandos con el receptor^{95,96}.

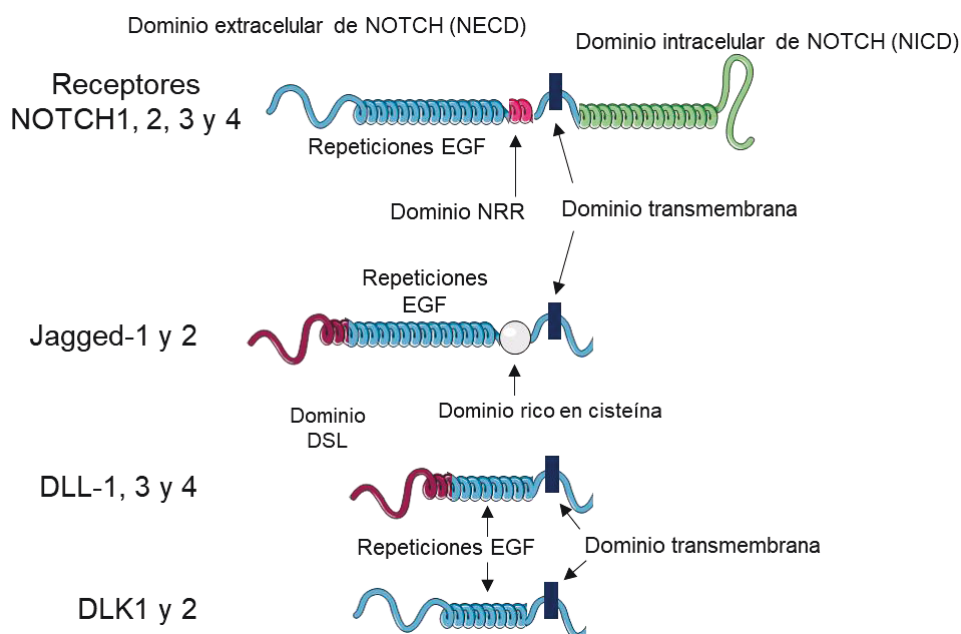


Figura 4. Principales componentes de la vía de señalización de NOTCH. NRR: Región reguladora negativa.

Aunque DLK1 sea un ligando no canónico de NOTCH, también actúa de manera NOTCH-independiente como inhibidor endógeno de la adipogénesis y regulador de la diferenciación de adipocitos (en este caso denominado Pref-1). De este modo, se ha descrito que mientras la sobreexpresión de DLK1 *in vivo* disminuye materia grasa, los marcadores de adipocitos y los factores secretados por los mismos mediante la activación de la vía de las MAPK/ERK^{97,98}, los ratones deficientes en DLK1 muestran una adipogénesis más acelerada^{97,99,100}. Sin embargo, otros estudios han sugerido que los efectos reguladores de DLK1 en la adipogénesis también estarían mediados por la regulación directa DLK1-NOTCH, pudiendo inhibir o activar la adipogénesis según el contexto celular y la expresión y activación de NOTCH⁹⁰. Por otro lado,

DLK1 también juega un papel importante en el crecimiento y diferenciación celulares^{92,101}, como se ha descrito en el epitelio gastrointestinal en desarrollo¹⁰², en condrocitos¹⁰³ y masa ósea¹⁰⁴, a nivel vascular¹⁰⁵, e incluso a nivel neuronal¹⁰⁶.

En cuanto a los receptores de la vía NOTCH, se conocen 4 tipos denominados desde NOTCH1 a NOTCH4. Todos ellos necesitan un procesamiento proteolítico antes de ser transportados a la membrana. Brevemente, después de ser expresados en el retículo endoplasmático, los receptores se dirigen a la membrana del Golgi para ser procesados en una serie de eventos postraduccionales mediados por las proteasas parecidas a furina, las cuales realizan el primer corte en la región S1 del receptor dando lugar a una proteína que ya puede ser transportada a la membrana celular⁹⁶.

6.1 Activación de la vía de señalización de NOTCH y sus funciones

La activación de la vía de señalización de NOTCH se produce cuando una célula adyacente posee en su membrana un ligando transactivador, como podría ser Jagged-1 y se une al receptor de la célula vecina a través del dominio DSL (activación en trans). Se cree que esta unión altera la conformación de la región reguladora negativa de NOTCH, lo que permite el acceso de las enzimas proteolíticas ADAM17 (también denominada enzima convertidora de TNF- α o TACE) o ADAM10 al dominio S2 donde realizan un corte que libera el dominio extracelular de NOTCH (NECD)^{93,107}. Acto seguido, se produce un segundo corte proteolítico en la parte interna del receptor de NOTCH en el sitio de corte S3 mediado por el complejo de la γ -secretasa. Este corte produce la liberación del dominio intracelular de NOTCH, denominado NICD, el cual, gracias a la acción de las α -importinas, se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción uniéndose al complejo represor CSL (*CBF1/Supressor of Hairless/LAG-1*) en mamíferos, o también conocido como proteína J kappa de unión a la señal de recombinación (RBP-J κ) en ratones^{96,107}. La unión de NICD con este complejo activa la transcripción de los genes efectores de la vía de señalización de NOTCH, conocidos como HES (*Hairy and enhancer of Split*) 1-4, 5 y 7 y HERP (proteínas represoras relacionadas con HES) también denominadas HEY 1-3 (**Figura 5**). Estos efectores juegan un papel relevante en procesos tan importantes del desarrollo como son la diferenciación, la apoptosis y la proliferación celular^{96,107}.

De manera general, se ha descrito una especial relevancia la vía de señalización de Jagged-1/NOTCH en cáncer, donde se ha observado un aumento en la expresión de este ligando unido a una activación de la vía en diferentes carcinomas, como son los hepatocelulares, gástricos, y gliomas¹⁰⁸. Con respecto al ligando DLL-3, también se ha descrito en humanos una patología asociada a mutaciones en este ligando, denominada disostosis espondilocostal, donde aparecen anomalías en las costillas asociadas a defectos en las segmentaciones vertebrales¹⁰⁹. Mientras que la delección génica de *Notch1* en ratones es letal, los delecionados en NOTCH3, a pesar de presentar niveles inferiores de timocitos, no lo son¹¹⁰⁻¹¹². Se han descrito que diferentes mutaciones de NOTCH1 en humanos dan lugar a patologías de la piel, como pueden ser

psoriasis, dermatitis atópica o el síndrome de Adams-Oliver que se caracteriza además por presentar malformaciones en las extremidades^{113,114}. Por otro lado, las mutaciones de NOTCH3 se han asociado con una patología cerebrovascular denominada CADASIL, que cursa con arteriopatías cerebrales con infartos subcorticales y leucoencefalopatías¹⁰⁹. Finalmente, las mutaciones en el gen de NOTCH2 y en el dominio DSL de Jagged-1 pueden causar el síndrome de Alagille, que afecta a diversos órganos como el corazón, el hígado o los riñones^{115–117}. Además del síndrome de Alagille, otras mutaciones en el gen de Jagged-1 ocasionan el síndrome de Hajdu-Cheney, que cursa con destrucción de hueso¹¹⁸.

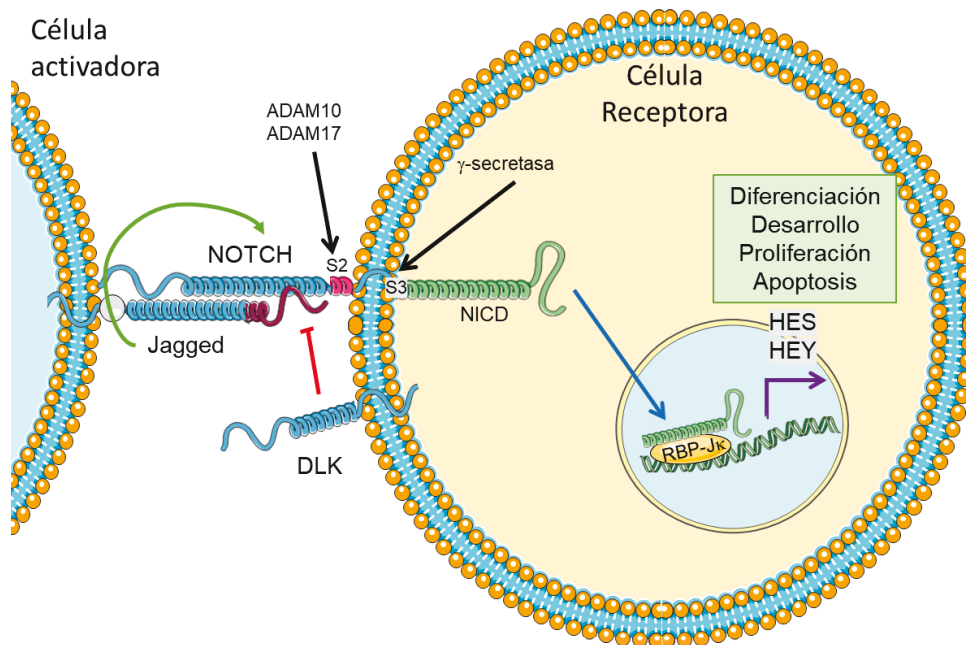


Figura 5. Vía de señalización de NOTCH. Código de colores de flechas: Verde= activación, roja=inhibición, negra= corte proteolítico, azul= translocación, morada= transcripción.

6.2 Papel de la vía de señalización de NOTCH en el desarrollo del riñón y en sus patologías

Algunas de las mutaciones en los componentes de la vía de señalización de NOTCH descritas anteriormente también provocan problemas renales¹¹⁸. Durante el desarrollo embrionario, NOTCH1 y NOTCH2 se encuentran expresados en la vesícula renal a tiempos tempranos, de los cuales NOTCH2 es necesario para la correcta estructuración y diferenciación de podocitos y túbulo proximal¹¹⁹. Jagged-1 y NOTCH2 se expresan en el túbulo colector, NOTCH3 en el segmento que dará lugar a las células tubuloepiteliales, mientras que NOTCH4 se localiza casi exclusivamente en células endoteliales¹²⁰. Por otra parte, los efectores HES-1 y HES-5 también son necesarios para la correcta nefrogénesis del eje tubular proximal-distal¹²¹.

A diferencia de lo observado durante el desarrollo embrionario, se ha descrito que en el riñón adulto sano prácticamente no se expresan ninguno de los componentes de la vía de señalización

de NOTCH¹²⁰. Sin embargo, sí se ha descrito una reexpresión de los componentes de esta vía en diferentes enfermedades renales humanas, como pueden ser la nefropatía membranosa, la nefropatía por IgA, la nefropatía diabética, la nefritis lúpica, la glomerulonefritis de cambios mínimos o la glomeruloesclerosis focal segmentaria¹²⁰. En estas patologías se observó que la fibrosis tubulointersticial estaba asociada a la activación de la vía de NOTCH-1, en los cuales existía una correlación entre la expresión de este receptor en podocitos con una mayor albuminuria y glomeruloesclerosis¹²⁰. De manera similar, estudios experimentales en ratones modificados genéticamente han demostrado que la sobreexpresión de N1ICD en los túbulos proximales renales se ha asociado con una fibrosis intersticial, sobretudo mediada por un aumento en la proliferación celular. Además, la sobreexpresión de NOTCH1 activo en podocitos genera glomeruloesclerosis y pérdida de función renal a las pocas semanas de nacimiento^{122,123}. Sin embargo, en biopsias de pacientes con nefroesclerosis hipertensiva la vía de señalización del eje Jagged-1/NOTCH1 no se encontró activada, como también se observó en un modelo de hipertensión causado por administración de angiotensina II en ratas^{124,125}.

En un estudio de asociación de genoma completo de diferentes enfermedades renales humanas, la expresión de Jagged-1 y NOTCH2 fue la que más se correlacionaba con la fibrosis¹²⁶. Además, los autores confirmaron el aumento de la expresión de estos dos genes también en los modelos renales experimentales de UUO y de la nefropatía inducida por inyección de ácido fólico¹²⁶. Consecuentemente, la delección específica de NOTCH2 en los túbulos renales resultó en una disminución de la fibrosis intersticial¹²⁶. Por otra parte, otros estudios preclínicos han demostrado que NOTCH3 es clave en la regulación de la fibrosis renal. así, la delección génica de NOTCH3 resultó en una disminución de la fibrosis tubulointersticial en el modelo de UUO¹²⁷. También se ha demostrado que la administración preventiva en el modelo de UUO con DAPT, el inhibidor de la γ -secretasa, y, por tanto, inhibidor de la activación de la vía de señalización de NOTCH, disminuyó la expresión de diversos genes y proteínas asociados con producción de MEC y fibrosis, como son la fibronectina y CCN2¹²⁸.

Diversos factores implicados en el daño renal son capaces de activar la vía de señalización de NOTCH, entre ellos destaca Gremlin. Estudios de alineamiento de los genes de humano, ratón y rata han descrito que existe una gran similitud entre los componentes de la ruta de NOTCH, Jagged-1 y HES-1 con Gremlin, tanto en la estructura del promotor génico como en los elementos de unión a micro-ARNs. Además, mediante técnicas de hibridación *in situ* se observó una colocalización de estos tres genes en los túbulos proximales-renales en biopsias de pacientes con nefropatía diabética¹²⁹. A nivel funcional, se ha demostrado que Gremlin, vía VEGFR2, es capaz de inducir la expresión de Jagged-1, y dar lugar a la activación de la vía de señalización de NOTCH1 en células tubulares epiteliales humanas y en el riñón *in vivo*, como se demostró en un modelo de inyección de Gremlin en el parénquima renal en ratones¹³⁰. Además, la activación de la vía de señalización de NOTCH1 por Gremlin está asociada a la inducción de la TEM parcial en células epiteliales proximales humanas en cultivo¹²⁸ (**Figura 6**). En ese trabajo se demostró que la inhibición de la vía de señalización de NOTCH1 utilizando DAPT revertió los efectos inducidos por la estimulación de Gremlin de tal forma que redujo los marcadores

mesenquimales α -SMA y vimentina y aumentó los marcadores de epitelio E-cadherina y citoqueratina, revirtiendo los cambios de fenotipo observados en las células tubuloepteliales¹²⁸.

Por otra parte, los estudios realizados en un modelo de inyección de Gremlin en ratones también mostraron que la activación de la vía de señalización de NOTCH1 provocaba un aumento en la señalización de la vía de NF- κ B, aumentando así la producción de genes proinflamatorios y células inflamatorias infiltrantes en el riñón de macrófagos, neutrófilos y linfocitos TCD3+ (**Figura 6**). Además, el uso de un inhibidor farmacológico de la γ -secretasa, el DAPT, disminuía los niveles de citoquinas proinflamatorias e infiltración de estas células inmunes lo cual estaba asociado a la inhibición de la activación de la vía de señalización de NOTCH1¹³⁰.

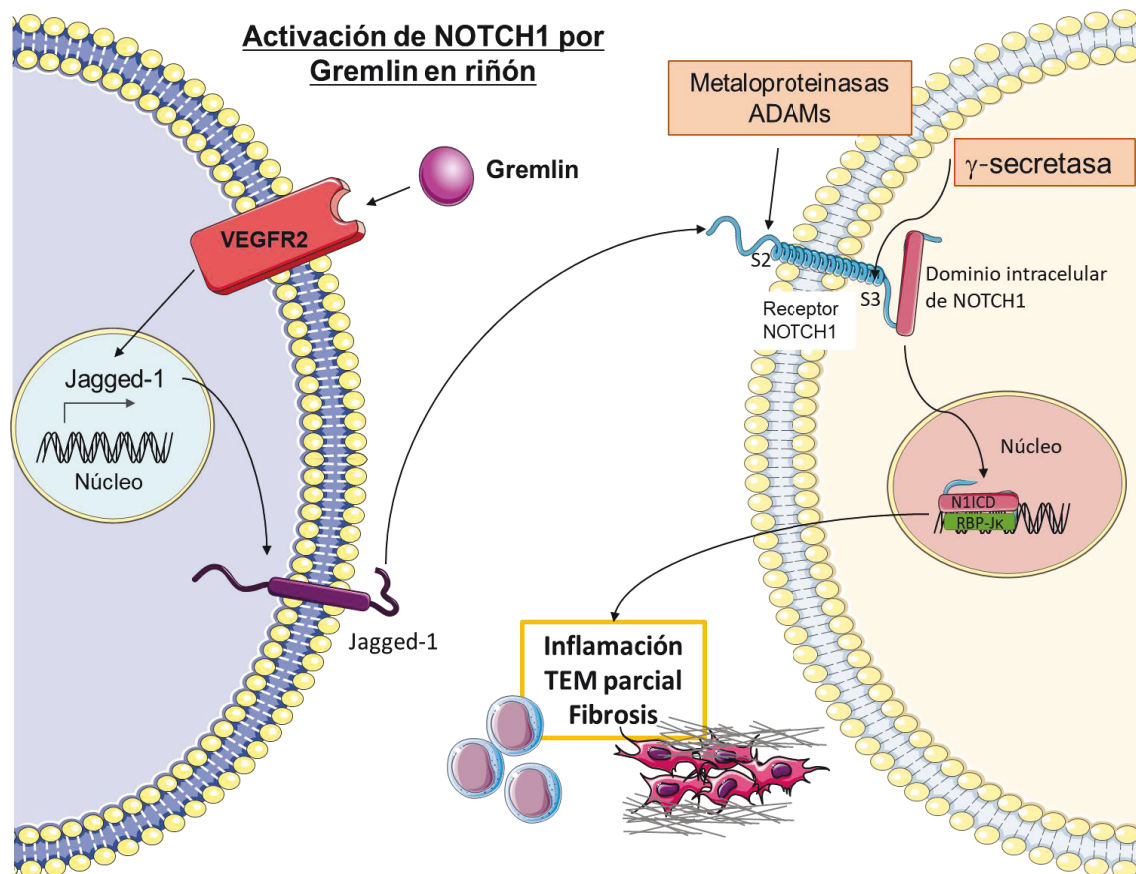


Figura 6. Eje de señalización Gremlin/Jagged-1/NOTCH1 y sus efectos en el riñón. Modificado de (76).

6.3 Papel de la vía de señalización de NOTCH en la inflamación: diferenciación de linfocitos T

La importancia de la vía de señalización de NOTCH en la respuesta inflamatoria viene dada por numerosos estudios, realizados en primer lugar en células hematopoyéticas y tumorales y posteriormente *in vivo*, en los que se sugiere la interacción entre la vía de señalización de NOTCH y la vía del NF- κ B, de tal forma que NOTCH puede regular la transcripción de diversos componentes de NF- κ B¹³¹. Además de su interacción con la activación de NF- κ B, la vía de señalización de NOTCH tiene una especial importancia en la supervivencia, proliferación y

diferenciación de las células inmunes, siendo especialmente relevante en el desarrollo de los linfocitos T¹³². De este modo, una vez que los linfocitos T periféricos ya se han desarrollado en el timo, se ha descrito que la expresión de NOTCH está relacionada con la activación, proliferación y producción de citoquinas por parte de estos linfocitos¹³². Simultáneamente a la regulación de los diferentes receptores de NOTCH, se necesita una orquestada expresión de la vía de señalización de NF- κ B para dar lugar a los diferentes subtipos de linfocitos T en el timo¹³³. De manera breve, la activación latente y continuada de NOTCH1 es necesaria para diferenciar a los timocitos dobles negativos (CD4- CD8-) de otras células que no sean linfocitos T (como macrófagos o células dendríticas)¹³⁴, mientras que la posterior activación dual de NOTCH1 y NOTCH3 es necesaria para que los timocitos dobles negativos que ya hayan conseguido el receptor de linfocitos T (TCR) sigan desarrollándose a sus siguientes etapas y den lugar a los linfocitos T CD4+ o CD8+, donde NOTCH participa de manera crítica^{110,135}. Además de la participación de los receptores, también es necesaria una distribución espacial específica de todos los ligandos de la vía en el timo, a excepción de DLL3, para el correcto desarrollo de los timocitos hacia linfocitos T¹³³. Además, los diferentes ligandos y receptores de NOTCH juegan un papel clave en la diferenciación de los linfocitos TCD4+ cooperativos (Th) indiferenciados hacia los diferentes subtipos de Th, como pueden ser Th1, Th2 o Th17¹³².

7. Respuesta inmunológica Th17

Aunque tradicionalmente se consideraba que los linfocitos TCD4+ se diferenciaban en dos subtipos celulares denominados Th1 y Th2, más recientemente se ha demostrado que pueden dar lugar a otros subtipos dependiendo del microambiente de citoquinas en el que se encuentren, así como de los factores de transcripción que expresen, presentando así diferentes fenotipos y realizando diferentes funciones¹³⁶. De este modo, aparte de los citados subtipos, los linfocitos TCD4+ pueden diferenciarse a linfocitos Th9, Th folicular, Th22, T reguladores y Th17^{137,138}. A pesar de esta nueva clasificación, se ha descrito también una gran plasticidad en la diferenciación de los diferentes subtipos de tal forma que se han demostrado la existencia de subtipos intermedios lo que hace el estudio de la diferenciación de estos linfocitos siga siendo objeto de investigación y haya dado lugar a una gran controversia entre los investigadores¹³⁹.

Uno de los subtipos que ha adquirido mayor relevancia durante los últimos años es el de los linfocitos Th17. De forma breve, los linfocitos Th17 se diferencian desde un linfocito TCD4+ indiferenciado a partir de las acciones de la IL-6 y del TGF- β , los cuales, a través de una cascada de activación intracelular, inducen la expresión nuclear de los factores de transcripción del receptor huérfano gamma t relacionado con el receptor del ácido retinoico (ROR γ t) y del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3). El último paso en la diferenciación de estos linfocitos viene dado por la expresión de la IL-23, que se encarga de estabilizar la población de este subtipo linfocitario¹⁴⁰. Una vez diferenciados, los linfocitos Th17 son capaces de liberar al medio diversas citoquinas como la IL-22, la IL-26, el ligando CCL-20 y la IL-17, esta última la más relevante y estudiada^{139,140}. Curiosamente, aparte de los linfocitos

Th17, se han descrito otros subtipos celulares que son capaces de liberar al medio IL-17, entre los que se encuentran tanto células de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, incluidos los linfocitos T $\gamma\delta$, las células *Natural Killer*, los linfocitos TCD8+ citotóxicos, los neutrófilos, células linfoides innatas y mastocitos, aunque la expresión de IL-17 por estas dos últimas es un motivo de controversia ya que algunos investigadores defienden que únicamente tienen capacidad de almacenarla pero no de producirla^{139,141} (**Figura 7**).

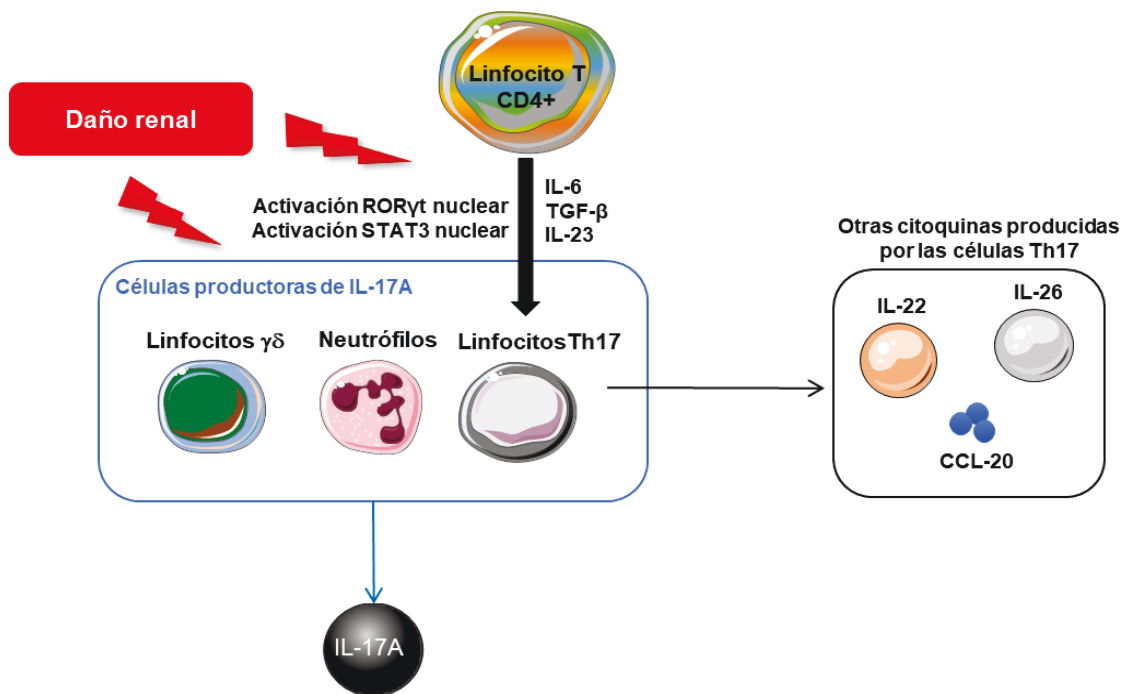


Figura 7. Células productoras de IL-17A en el contexto del daño renal. Modificado de (139).

La familia de la IL-17 está compuesta por 6 miembros diferenciados por letras y que abarcan desde la IL-17A hasta la IL-17F, de las cuales la primera es la que más estudios ha suscitado¹⁴². A pesar de que todas ellas poseen diferentes funciones, la mayoría regulan respuestas proinflamatorias, autoinmunes y de eliminación de patógenos, ya que son capaces de activar a diferentes tipos celulares; desde células epiteliales hasta células infiltrantes como pueden ser los neutrófilos¹⁴²⁻¹⁴⁴. Los miembros de esta familia se encuentran muy conservados a nivel evolutivo en mamíferos, presentando una gran homología entre los diferentes subtipos, sobre todo entre la IL-17A y la IL-17F las cuales pueden formar heterodímeros entre sí. Además de formar heterodímeros, la IL-17A también puede actuar formando homodímeros unidos por un puente disulfuro¹³⁹. Los receptores de la IL-17 (IL-17R) están presentes en una gran cantidad de tipos celulares y también tienen la capacidad de formar tanto homodímeros como heterodímeros. Constan de 5 miembros, nombrados desde en este caso desde la IL-17RA hasta la IL-17RE. Dado que IL17RA es el receptor que se encuentra mayoritariamente en células inmunitarias, la mayoría de homodímeros que se forman son de IL-17RA mientras que el resto de los receptores son más específicos de otros tipos celulares determinados¹³⁹. En cuanto a la afinidad de los ligandos por el receptor, también se ha descrito que existen diferencias en cuanto a la especificidad ligando-receptor. Así, la IL-17A se une con más afinidad al IL-17RA mientras que

la IL-17F lo hace al IL-17RC, lo cual serviría también para explicar la gran variabilidad en las subsecuentes respuestas mediadas por estas uniones¹³⁹.

En cuanto a la activación de la vía de señalización intracelular, esta tendría lugar mediante la unión ligando-receptor. De forma breve, en el caso concreto de IL-17A, su unión con un heterodímero formado por IL-17RA/IL-17RC, expresado en células epiteliales, produce la activación de la proteína activadora de NF- κ B1 (ACT1) la cual ubiquitina al factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6) induciendo su degradación. La degradación de TRAF6, el cual actúa como inhibidor de varias respuestas celulares, da lugar a la activación de diferentes cascadas intracelulares, como la de NF- κ B y la ruta de las MAPK y a la consiguiente expresión de citoquinas proinflamatorias por las células epiteliales¹⁴⁵ (**Figura 8**).

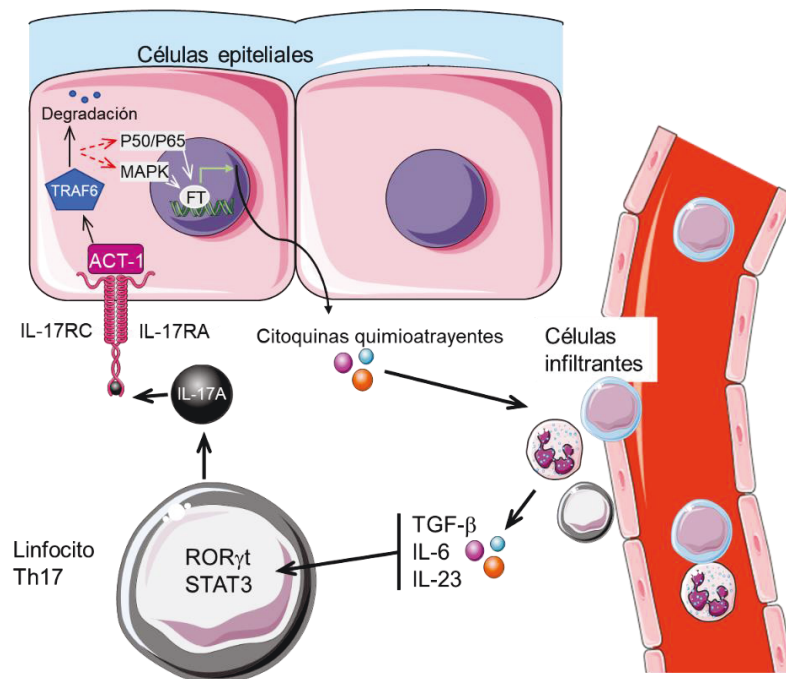


Figura 8. Señalización de Linfocitos Th17 en células epiteliales. FT: Factor de transcripción.

Prácticamente todas las células estromales son capaces de responder a la IL-17A: epiteliales, endoteliales, fibroblastos y algunas células inmunes¹⁴⁶. Debido a su participación en las respuestas inflamatorias y a su capacidad de unirse a multitud de células en diferentes tejidos, la IL-17A ha sido asociada con la patogénesis de múltiples enfermedades autoinmunes como son la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la psoriasis, las enfermedades inflamatorias intestinales y otras enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis y la hipertensión^{139,147-149}. De este modo, se ha descrito que los pacientes hipertensos presentan niveles plasmáticos elevados de citoquinas proinflamatorias, entre las que se encuentra la IL-17A, además de linfocitos TCD4+ circulantes lo que apoya la hipótesis del papel relevante de la IL-17A en el desarrollo de la hipertensión. Curiosamente, la hipertensión incipiente también se ha asociado con un incremento en los niveles de IL-17A séricos. Además, si la hipertensión está causada por

un aumento de sal en la dieta, esta puede ser un factor clave en la polarización de células T indiferenciadas a linfocitos Th17, como se ha sugerido recientemente¹³⁹.

7.1 Respuesta inmunológica Th17 en daño renal

En el ámbito renal, ya en 1998 se observó el papel de la IL-17A como inductora de la IL-6 y la IL-8 en células renales en cultivo, además de ser un factor que se encontraba sobreexpresado en pacientes con rechazo de trasplante renal y no en aquellos sin rechazo¹⁵⁰. Estudios posteriores demostraron que la estimulación con IL-17A producía un aumento de MCP-1 y de la proteína inflamatoria de macrófagos-1 (MIP-1) en células mesangiales murinas *in vitro*¹⁵¹. Otros trabajos experimentales, describieron una relación positiva entre la respuesta inmune Th1 y Th17, la disminución de la función renal y la formación de crescentes en un modelo murino de glomerulonefritis autoinmune¹⁵². Resultados similares fueron encontrados en el modelo de UUO, en el cual se demostró la importancia de la IL-1 α/β secretada por las células dendríticas en la activación respuesta inmunitaria inflamatoria de los linfocitos Th17¹⁵³. En un modelo de administración sistémica de CCN2 se observó una respuesta inflamatoria sostenida en el riñón, mediada por la activación de la respuesta inmune Th17¹⁵⁴. A nivel clínico, la respuesta inmunitaria Th17 y la IL-17A se han asociado con diferentes patologías renales como la nefritis lúpica y esclerosis lateral amiotrófica donde se encontraron niveles elevados de la IL-17A y de células liberadoras de IL-17A^{155,156}. En pacientes con vasculitis asociada a ANCA se encontraron niveles aumentados en suero, tanto de la IL-17A como de la IL-23¹⁵⁷, del mismo modo que se observó un aumento de neutrófilos liberadores de esta citoquina a nivel renal en aquellos pacientes que desarrollaban glomerulonefritis¹⁵⁸.

Por otra parte, también se han encontrado evidencias del importante papel deletéreo que juega la IL-17A en la diálisis peritoneal, una de las terapias sustitutivas de la enfermedad renal. Las biopsias peritoneales de estos pacientes mostraron presencia de IL-17A en las zonas profibróticas y proinflamatorias de la capa submesotelial, y esto se correlacionó con fibrosis peritoneal, mientras que en el peritoneo de controles sanos no se expresaba¹⁵⁹. Del mismo modo, en un modelo experimental de diálisis peritoneal, se comprobó que la exposición crónica al líquido de diálisis generaba una mayor presencia de células infiltrantes liberadoras de IL-17A a nivel peritoneal además de una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias y un engrosamiento de la membrana peritoneal¹⁵⁹. Entre las células liberadoras de IL-17A presentes en el daño peritoneal se han identificado los linfocitos Th17, los linfocitos $\gamma\delta$, los neutrófilos y los mastocitos¹⁶⁰. Extendiendo aún más estos resultados, un estudio realizado en un modelo de diálisis peritoneal en ratones deficientes en CD69, glicoproteína de membrana que modula negativamente la diferenciación Th17 por las vías de las JAK3(Quinasas de Janus 3)/STAT5, se demostró una hiperactivación de la respuesta Th17 y un aumento de la producción de IL-17A en el efluente peritoneal¹⁶¹. Además, esta respuesta exacerbada estaba asociada con un aumento de la respuesta inflamatoria y fibroproliferativa de la membrana peritoneal en los ratones dializados, mientras que el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de la IL-17A disminuyó el grado de fibrosis peritoneal¹⁶¹. Estos resultados ponen de manifiesto el relevante papel de la IL-

17A en el aumento de la inflamación local submesotelial por la IL-17A, que a largo plazo provoca un aumento del engrosamiento de la membrana peritoneal¹⁶⁰.

Otra de las enfermedades renales en las que se ha demostrado que la IL-17A juega un papel muy relevante es la nefropatía diabética. Cada vez existe más consenso en cuanto a considerar la diabetes como una enfermedad inflamatoria¹⁶². De este modo, numerosas evidencias relacionan el papel que juegan las células inmunitarias en la progresión de la diabetes y de la nefropatía diabética, como puede ser un desequilibrio entre el ratio Th17 y T reguladoras en la diabetes tipo 1 o la reprogramación metabólica que sufren los linfocitos Th17^{162,163}. Curiosamente, los niveles circulantes de la IL-17A se han relacionado con la gravedad del daño renal de tal forma que los niveles disminuyen progresivamente desde los sujetos con tolerancia normal a la glucosa hasta los sujetos con diabetes tipo 2 con y sin nefropatía diabética¹⁶⁴. En concordancia con este resultado, un estudio realizado en pacientes con nefropatía diabética avanzada demostró la presencia de niveles más bajos de IL-17A en plasma y orina comparados con pacientes con nefropatía diabética temprana¹⁶⁵. Sin embargo, en otro estudio realizado también en pacientes con nefropatía diabética determinaron un mayor número de linfocitos Th foliculares y un nivel plasmático mayor de IL-6 e IL-17A cuando se comparaban con sujetos sanos¹⁶⁶. Del mismo modo, se han encontrado resultados contradictorios en la nefropatía diabética experimental en cuanto al papel que juega la IL-17A¹⁶². Por un lado, en ratones deficientes en IL-17A a los que se les indujo diabetes experimental con estreptozotocina, las lesiones renales fueron más graves que en los animales sin modificar genéticamente que expresan el receptor¹⁶⁵. Además, la administración de IL-17A o IL-17F recombinante a bajas concentraciones en estos animales redujo la albuminuria y el daño renal atribuyendo los efectos protectores de la IL-17 a la inhibición de la activación de la STAT3, aunque no pudieron identificar sus células diana¹⁶⁵. De manera opuesta a estos resultados, un estudio reciente realizado también en el modelo de diabetes experimental inducido por estreptozotocina, demostró que tanto la administración de un anticuerpo neutralizante de la IL-17A, así como su delección génica disminuyó las lesiones renales en comparación con las observadas en los ratones que controlan, sugiriendo en este caso que la IL-17A promueve el desarrollo de la nefropatía diabética¹⁶⁷. En la misma línea que estos últimos datos, un modelo de nefropatía experimental realizado en ratones obesos deficientes en el receptor de leptina (BTBR ob/ob), los cuales se caracterizan por presentar unas lesiones similares a las observadas en la nefropatía diabética humana, se ha descrito que la administración de un anticuerpo neutralizante de IL-17A revierte las estructuras aberrantes de las lesiones renales como son una mitigación de la inflamación renal y una mejora de la función renal^{162,168}.

Por todo ello, la respuesta inmune Th17 en general, así como la IL-17A en particular, se han postulado como potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas a tener en cuenta para el tratamiento de la patología renal¹⁶⁹.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El ligando no canónico de NOTCH1, DLK1, podría tener un papel relevante en el desarrollo y la progresión de la enfermedad renal.

Objetivo general

Teniendo en cuenta que los estudios previos evaluando la activación de la vía de NOTCH a nivel renal se han centrado principalmente en la activación de esta vía mediada por sus ligandos canónicos, el objetivo principal de esta tesis se centrará en estudiar el papel que desempeña DLK1 en desarrollo y la progresión del daño renal experimental atendiendo a aquellos mecanismos en los cuales puede estar participando.

Objetivos concretos

1. Determinar los niveles de expresión de los ligandos no canónicos *Dlk1* y *Dlk2* en el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO).
2. Estudiar el efecto de la ausencia de DLK1 en el daño renal experimental, realizando el modelo de UUO en ratones deficientes en el gen de *Dlk1*. Este objetivo a su vez tendrá varios subobjetivos:
 - 2.1. Evaluar el daño histológico, caracterizando el infiltrado inflamatorio y la fibrosis renal.
 - 2.2. Determinar el estado de los componentes de la vía de señalización de NOTCH.
 - 2.3. Explorar dos de los mecanismos moleculares asociados al daño renal donde la ausencia de *Dlk1* podría estar participando: la ruta de señalización de NF- κ B, así como sus citoquinas proinflamatorias asociadas, y la respuesta inmunológica Th17.
3. Evaluar si la inhibición de la vía de NOTCH regula la respuesta inmunológica Th17 en el daño renal experimental por UUO.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos experimentales animales

Los experimentos realizados en animales fueron aprobados por el comité ético de la institución en la que se realizaron (IIS-FJD, Universidad Autónoma de Madrid y Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) y de acuerdo con la normativa nacional vigente (BOE numero 268 Ley 32/2007 y BOE num.34 Real Decreto 53/2013).

Los modelos animales se realizaron en ratones macho de la cepa C57BL/6 y de la cepa 129/SvJ con una delección sistémica del gen *Dlk1* de entre 3-4 meses de edad. Debido a las recomendaciones de las autoridades éticas acerca del principio de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) en animales de experimentación y a que ambas cepas mostraron activación de la vía de señalización de NOTCH¹³⁰ y de la respuesta Th17 inmunitaria¹⁵⁴ (dos de los procesos a estudiar en esta tesis) sugiriendo que no existen diferencias entre ambos genotipos, se utilizaron ratones C57BL/6 para estudiar los efectos de la inhibición farmacológica de la activación de la vía de señalización de NOTCH. Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas, con el fin de disminuir su exposición a agentes patógenos, y se les proporcionó un acceso *ad libitum* a agua y a la dieta estándar provista por el departamento encargado de la cría y el mantenimiento de los animales de cada institución.

1.1 Ratones con delección sistémica del gen *Dlk1*

Los ratones de la cepa 129/SvJ modificados genéticamente con una delección en el gen de *Dlk1* fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Santiago Lamas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa por lo que todas las cirugías realizadas en estos animales se llevaron a cabo en el animalario de dicho centro. Aunque esta cepa de ratones ha demostrado ser viable ya que la delección del gen de *Dlk1* no es deletérea, los ratones deficientes en *Dlk1* presentan una gran mortalidad perinatal. Además, la proteína DLK1 desempeña funciones muy importantes en el desarrollo y el crecimiento, y su ausencia produce malformaciones esqueléticas y anormalidades en la formación de los pulmones, que pueden contribuir a un aumento de la mortalidad perinatal^{170,171}. El papel esencial de *Dlk1* también se ha demostrado en el desarrollo de otra multitud de órganos y tipos celulares como el músculo esquelético¹⁷², los linfocitos B¹⁷³ y la homeostasis de adipocitos¹⁷⁴.

1.2. Modelo experimental de Obstrucción Unilateral del Uréter

La cirugía necesaria para realizar la Obstrucción Unilateral del Uréter, de ahora en adelante denominado como UUU (de sus siglas en inglés *Unilateral Ureteral Obstruction*), se llevó a cabo en ratones anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano (FORANE, AbbVie Farmacéutica). Una vez comprobada la profundidad de la anestesia mediante el reflejo podal y el pellizco en la cola, los ratones fueron inmovilizados en posición supina y se les realizó una incisión en la zona ventral izquierda para acceder al uréter izquierdo y proceder a la obstrucción. La ligadura del uréter se

llevó a cabo realizando dos ligaduras en dos puntos de este con sedas de 5/0 y efectuando un corte entre ambos puntos para evitar posibles infecciones posteriores del tracto urinario. Este riñón, se denominó riñón obstruido, mientras que el riñón derecho, en el cual no se le realizó ninguna cirugía, se denominó riñón contralateral y sirvió como control endógeno del modelo en cada animal. Después de la obstrucción se procedió al cierre de la incisión utilizando sedas de 5/0 para suturar el peritoneo y de 4/0 para la piel.

Cabe destacar que en este modelo animal no hay una disfunción renal ya que el riñón contralateral suple las funciones fisiológicas del riñón obstruido¹⁷⁵, por lo que no se realizaron medidas de la función renal en ninguno de los grupos estudiados. La elección de este modelo experimental para el presente trabajo viene dada por la amplia investigación previa en el daño renal experimental donde ha sido utilizado para estudiar diversas rutas de señalización celular. Se trata de un modelo de daño renal progresivo, donde se pueden estudiar los inicios del daño renal y la posterior progresión que da lugar al fallo del órgano por un aumento de la inflamación y fibrosis¹⁷⁵.

Para realizar la eutanasia, los animales recibieron una dosis letal de Xilacina (Rompun; 5mg/kg) y Ketamina (Ketolar; 35mg/kg). Cuando se comprobó que los animales no respondían al reflejo podal y al pellizco en la cola, se realizó una incisión abdominal hasta llegara la cavidad cardiaca donde se perfundió suero salino frío directamente a través del ventrículo izquierdo del corazón. Cuando el animal se desangró por completo, se extrajeron los dos riñones, se eliminó la cápsula que los envuelve y se dividieron en varias secciones para realizar los posteriores estudios. De este modo, un cuarto de riñón se fijó en paraformaldehído al 4% y posteriormente se incluyó en parafina para estudios histoquímicos. El resto se congeló en nitrógeno líquido con el propósito de evaluar la expresión de genes y proteínas.

1.2.1 Modelo experimental de UUO en ratones modificados genéticamente de la cepa 129/SvJ

La cirugía de UUO se realizó en ratones de la cepa 129/SvJ de tipo salvaje, de ahora en adelante denominados WT (de sus siglas en inglés *wild-type*) y en ratones con una delección sistémica del gen de *Dlk1* de la misma cepa siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, incluyendo entre 4 y 9 animales por grupo y realizando la eutanasia tras 2, 5, 10 y 14 días tras la obstrucción (**Figura 9**).

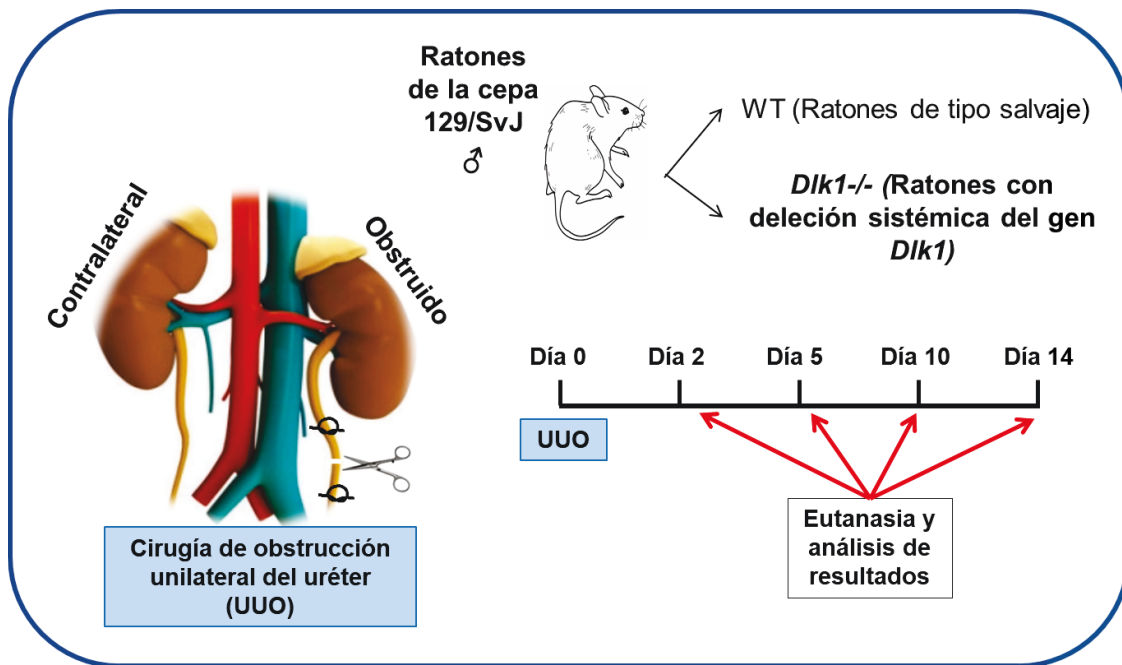


Figura 9. Modelo experimental de obstrucción unilateral del uréter en ratones de la cepa 129/SvJ con deleción sistémica del gen *Dlk1*.

1.2.2 Modelo experimental de UUO con administración de DAPT en ratones de la cepa C57BL/6

El modelo de UUO en ratones de la cepa C57BL/6 se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en los ratones de la cepa 129/SvJ pero incluyendo un grupo de ratones seleccionado aleatoriamente al que se le administró intraperitonealmente DAPT (100 μ g/día, Calbiochem; CAS 208255-80-5), y otro grupo que recibió el vehículo. El DAPT (*N*-[*N*-(3,5-Difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester)) es un inhibidor de la enzima γ -secretasa, también conocido como “ γ -secretase Inhibitor IX”, la cual se encarga de realizar el segundo corte en el sitio S3 del receptor de NOTCH y liberar así el dominio intracelular de NOTCH (NICD) para que pueda realizar sus funciones como factor de transcripción (Figura 10). La dosis elegida se basó en estudios previos donde usaron un inhibidor farmacológico de la γ -secretasa de la misma familia que el DAPT y demostraron que la dosis más efectiva y que no presentaba toxicidad *in vivo* era de 100 μ g/ratón de por día¹²², diluido en suero salino con DMSO¹³⁰. La administración del tratamiento comenzó el día anterior a la operación y fue repetido diariamente hasta el día de la eutanasia. El tiempo de estudio elegido fue de 5 días de obstrucción y cada grupo contó con entre 5 y 10 ratones (**Figura 10**). Además de los grupos expuestos anteriormente, también se realizó un grupo adicional de control de la operación (*sham*), en el cual los ratones sufrieron todo el procedimiento realizado en el grupo UUO excepto la obstrucción del uréter.

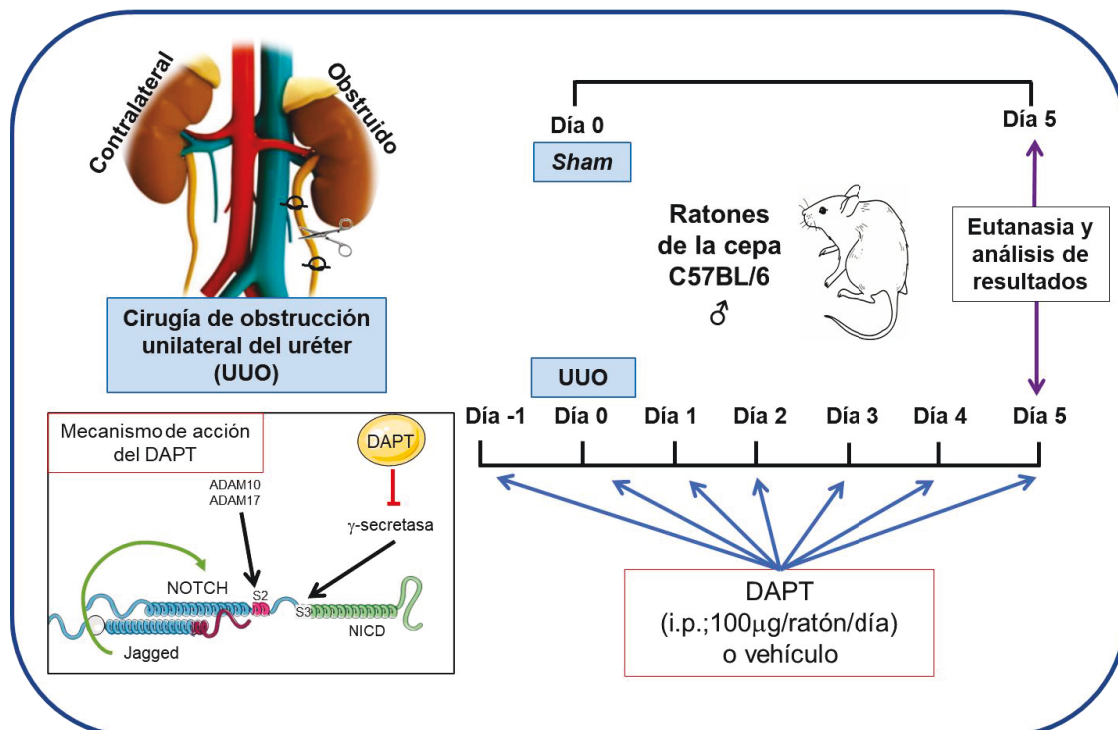


Figura 10. Modelo experimental de obstrucción unilateral del uréter en ratones de la cepa C57BL/6 y tratados con el inhibidor de la γ -secretasa, DAPT. Código de colores de flechas en el mecanismo de acción del DAPT: verde, activación; negra, corte proteolítico; roja, inhibición.

2. Estudios proteicos

La obtención de proteínas totales del tejido renal se realizó machacando de forma mecánica con varillas de plástico el tejido congelado en un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM); EGTA (2 mM); Triton X-100 (0,2 %); NP-40 (0.3 %); cóctel de inhibidores de proteasas (ROCHE cOMplete™ Protease Inhibitor Cocktail, 1 pastilla por cada 10mL de tampón de lisis) y cóctel de inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP™ de Roche, 1 pastilla por cada 10mL de tampón de lisis). El resto de los reactivos utilizados se adquirieron en Sigma. Una vez lisado el tejido se realizaron tres ciclos de agitación fuerte durante 10 segundos, seguidos de 10 minutos de reposo en hielo. Para finalizar, se centrifugaron los tubos a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, y se conservaron a -80°C.

Utilizando otra porción de los riñones, se obtuvieron las proteínas del extracto nuclear separadas del extracto citoplasmático usando reactivos comerciales específicos para este fin (NE-PER™; Thermo-Scientific) y utilizando las instrucciones provistas por el fabricante. La concentración proteica de cada muestra fue determinada mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA), usando una recta patrón de concentración de albúmina sérica conocida.

2.1. Técnica de Western blot

Una vez extraídas las proteínas y conocidas sus concentraciones, se separaron entre 40-50 µg de proteína total de cada muestra mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (8-12%) en condiciones reductoras. Una vez separadas en el gel, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Bio-rad) y posteriormente se les aplicó la tinción de rojo Ponceau para determinar la calidad de la transferencia. Una vez se comprobó esto, las membranas se limpiaron abundantemente con TBS (1mM Tris, 10mM NaCl, pH 7,4) al que se le añadió Tween-20 al 0,1% (TBST) y se bloquearon incubándolas durante una hora con leche desnatada en polvo (5% en TBST) con el fin de eliminar las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Transcurrida una hora, se incubaron las membranas con los respectivos anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante toda la noche en rotación a 4°C (**Tabla 1**). Al día siguiente se lavaron las membranas con abundante TBST 3 veces durante 10 min, para después incubarlas durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano picante (HRP) (**Tabla 2**). Una vez terminada esta última incubación, las membranas se volvieron a lavar abundantemente como en el paso anterior y se procedió a revelar la señal de la HRP mediante el kit de quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare). Finalmente, la obtención de las imágenes se llevó a cabo con el sistema ImageQuant LAS 4000, o bien con el sistema Amersham Imager 600 (ambos de GE Healthcare) y las bandas obtenidas se densitometraron y cuantificaron utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad).

Nombre anticuerpo	Dilución anticuerpo primario	Referencia, casa comercial
α -tubulina	1:5000	T5168, Sigma-Aldrich
ERK1/2	1:500	C-9 sc-514302, Sta. Cruz Biotechnology
GAPDH	1:5000	CB1001, Millipore
Jagged-1	1:500	sc-6011, Sta Cruz Biotechnology
N1ICD	1:500	ab8925, Abcam
NOTCH2	1:500	(D76A6) #5732T, cell signaling
NOTCH4	1:250	A-1 sc-393893, Sta. Cruz Biotechnology
NF- κ B p65	1:500	(C-20) sc-372, Sta. Cruz Biotechnology
p-I κ B- α	1:500	(B-9) sc-8404, Sta. Cruz Biotechnology
ROR γ T	1:1000	#14-6981-82, e-bioscience

Tabla 1. Concentraciones y referencias de los anticuerpos primarios usados en la técnica de Western blot.

Nombre anticuerpo	Dilución anticuerpo secundario	Referencia, casa comercial
Anti-cabra conjugado HRP	1:2500	Sc-2020, Santa Cruz Biotechnology
Anti-conejo conjugado HRP	1:2500	NA931, Amershan Biosciences
Anti-ratón conjugado HRP	1:5000	NA934, Amershan Biosciences

Tabla 2. Concentraciones y referencias de los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) usados en la técnica de Western blot.

3. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

Una vez procesados e incluidos en parafina, los riñones se cortaron en secciones de 3 μ m de grosor utilizando un microtomo y se montaron en portaobjetos previamente tratados (Dako) y adecuados para posteriores tinciones e inmunohistoquímicas. En primer lugar, los cortes se desparafinaron parcialmente toda la noche en una estufa a 65°C, posteriormente fueron sumergidos en xilol durante aproximadamente 10 min para desparafinarlos por completo y se hidrataron en una concentración decreciente de alcohol etílico (aproximadamente, 10 min a 100°, 10 min a 96° y 10 min a 70°) para acabar en agua destilada.

3.1. Evaluación del tejido renal

Para evaluar el nivel del daño renal de manera histológica se realizó una tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS). Los cambios tubulares (atrofia y dilatación) e intersticiales (inflamación perivascular y tubulointersticial) se evaluaron siguiendo una graduación de 0 a 4, donde 0 se corresponde con un tejido sin cambios; 1, con cambios que afectan al 25% del tejido; 2, con cambios que afectan del 25 al 50%; 3, con cambios que afectan del 50% al 75% y 4, con cambios que afectan del 75% al 100% de la muestra ¹⁷⁶.

Por otra parte, se realizó la tinción de tricrómico de Masson, con un kit de Sigma. En este caso la acumulación del colágeno del tejido se tiñe de color verde azulado. En ambas tinciones, los resultados fueron evaluados y cuantificados de manera ciega por un anatomopatólogo.

3.2. Ensayos inmunohistoquímicos

Estos estudios se realizaron para detectar los niveles y la localización de diversas proteínas en el tejido renal. Las secciones ya cortadas, montadas en los portaobjetos y desparafinadas se sometieron a la recuperación antigénica durante 20 min a 95° C en el sistema PT-link de DAKO, ajustando el pH (con tampón citrato a pH6 o tampón EDTA a pH9, ambos de DAKO) dependiendo de las instrucciones dadas por el fabricante de cada anticuerpo primario (**Tabla 3**). Una vez terminado este paso, se bloqueó la peroxidasa endógena durante 20 min con agua oxigenada al 3% y después se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente las uniones inespecíficas

del anticuerpo primario con una solución de bloqueo de caseína comercial de DAKO. Posteriormente, se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios correspondientes en diluyente de anticuerpos de DAKO (*Ab diluent*, DAKO) durante toda la noche a 4°C y en condiciones de humedad (Tabla 4). Al día siguiente, se lavaron las muestras con PBS 1X (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ y 1,8mM KH₂PO₄) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario biotinilado o conjugado a HRP. Transcurrido este periodo, en el caso de que se utilizara un anticuerpo secundario biotinilado, se realizó una incubación complementaria de las muestras con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (*Vecstastain Elite ABC HRP system*, Vector Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente, el cual fue previamente preparado e incubado durante media hora en agitación constante y en oscuridad. Para finalizar, las muestras se revelaron utilizando la 3,3'-diaminobencidina como sustrato (Abcam), se contrastaron con hematoxilina (Richard Allan Scientific) y se montaron con solución anhidra DPX (sigma) con cubreobjetos de cristal para posteriormente estudiarlas por microscopía. La especificidad de los anticuerpos secundarios se evaluó omitiendo el paso de incubación con los anticuerpos primarios en muestras aleatorias (no mostrado). Los resultados de expresión de proteína por inmunohistoquímica se cuantificaron a través del programa *Image Pro-Plus*, de los cuales se tomaron fotografías de la corteza renal al azar de 5 a 8 campos por muestra con el objetivo de 20X y los resultados se muestran como el aumento en n-veces del área teñida con respecto al área total o como el aumento n-veces de la cantidad de núcleos positivos en el campo contados manualmente.

Nombre anticuerpo primario	Dilución y pH	Referencia, casa comercial
α -SMA	1:200, pH9	Clon 1A4, A-2547 Sigma
CD3	1:100, pH9	A0452, DAKO
CD4	1X, pH9	IS649, DAKO
F4/80	1:50, pH6	MCA497, Bio-Rad
IL-17A	1:250, pH6	ab9565, Abcam
Mieloperoxidasa	1X, pH9	IS511, DAKO
N1ICD	1:300, pH6	ab8925, Abcam
NOTCH3	1:300, pH6	(D11B8) #5276S, cell signaling
STAT3	1:100, pH6	#8768S, cell signaling

Tabla 3. Concentraciones y referencias de los anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas a través de la técnica de inmunohistoquímica.

Nombre anticuerpo secundario	Dilución	Referencia, casa comercial
Anti-conejo biotinilado	1:200	RPN1004, Amershan Biosciences
Anti-rata biotinilado	1:200	#31834, Invitrogen
Anti-ratón biotinilado	1:200	RPN1001, Amershan Biosciences
Dual anti-ratón/conejo conjugado con peroxidasa de rábano	1X	K4063 EnVision™+ Dual Link System-HRP, DAKO

Tabla 4. Concentraciones y referencias de los anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas a través de la técnica de inmunohistoquímica.

4. Estudios de expresión génica

El ARN total del tejido renal congelado se obtuvo machacando los fragmentos de riñón de forma mecánica con varillas en tubos de plástico con Trizol (Invitrogen), según las indicaciones de la casa comercial. La concentración de ARN obtenida se midió con un espectrofotómetro y posteriormente se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés) con una transcriptasa inversa para obtener ADNc a partir de 2 µg de ARN utilizando un kit de alta capacidad de síntesis de ADNc (Applied). Los niveles de expresión génica determinados a partir del ADNc se estudiaron realizando una PCR a tiempo real mediante el sistema *Real-Time FAST PCR 7500* (Life Technologies). Se realizaron los estudios multiplex con distintas sondas (todas murinas y marcadas con el fluoróforo FAM) frente a los genes a estudiar, y utilizando como control endógeno para cada muestra una sonda que hibrida con el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) murina (marcada con el fluoróforo VIC) (Tabla 5). Todas estas sondas prediseñadas provienen de “Assay-on-Demand™ gene expression products” de Applied Biosystems. Los ciclos y temperaturas utilizados fueron:

Paso 1: 1 ciclo de 2 min a 50°C

Paso 2: 1 ciclo de 10 min a 95°C

Paso 3: 45 ciclos formados por dos etapas:

- Una subetapa de 15 segundos a 95°C
- Una subetapa de 60 segundos a 60°C

En esta última subetapa es en la cual el programa recogió las medidas de cada muestra, realizadas por duplicado. El número de copias del ARNm se calculó usando el valor que recoge el programa a partir del valor umbral Ct (Ciclo umbral). Los valores obtenidos para todos los genes estudiados fueron normalizados con respecto a su correspondiente valor de *Gapdh*.

Nombre gen	Referencia
<i>Ccl-19</i>	Mm00839967_g1
<i>Ccl2 (Mcp-1)</i>	Mm00441242_m1
<i>Ccl-21</i>	Mm03646971_gH
<i>Ccl5 (Rantes)</i>	Mm01302428_m1
<i>Cxcl10</i>	Mm00445235_m1
<i>Dlk1</i>	Mm00494477_m1
<i>Dlk2</i>	Mm01281511_g1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Hes-1</i>	Mm01342805_m1
<i>Hey-1</i>	Mm00468865_m1
<i>Jagged-1</i>	Mm00496902_m1
<i>Kim-1</i>	Mm00506686_m1
<i>Lcn2 (Ngal)</i>	Mm01324470_m1
<i>Notch2</i>	Mm00803077_m1
<i>Notch3</i>	Mm01345646_m1
<i>Notch4</i>	Mm00440525_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1

Tabla 5. Nombres y referencias de las sondas TaqMan utilizadas en los ensayos de PCR a tiempo real.

5. Análisis estadístico

Cabe destacar que en los estudios con animales con delección en el gen de *Dlk1* todos los valores de los componentes de la vía de señalización de NOTCH (ligandos, receptores y efectores), se normalizaron con respecto a los riñones contralaterales de los animales WT y se valoraron estadísticamente con respecto a estos, ya que se observaron diferencias en los niveles de expresión génica en diferentes componentes de esta vía entre los contralaterales WT y con delección en *Dlk1*. En cambio, en el resto de los análisis, los valores de los riñones obstruidos fueron normalizados con respecto a sus propios contralaterales, cuyo valor se representa como 1, ya que no se observaron diferencias en la expresión entre los contralaterales de ambos grupos. Todos los estudios se presentaron como aumento de n-veces y se mostraron gráficamente como la media \pm el error estándar de la media (EEM), excepto en la evaluación de la tinción histológica del PAS y en la cuantificación de la IL-17A positiva en las secciones renales del estudio de la delección de *Dlk1*, las cuales se presentaron en unidades arbitrarias y se mostraron gráficamente como la media \pm EEM. Tanto la elaboración de las gráficas de los resultados como el análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prism 5. La prueba estadística de elección para comparar los resultados fue la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, y se asumieron diferencias significativas con una $p < 0,05$.

Resultados

RESULTADOS

1. Los niveles de expresión de *Dlk1* y *Dlk2* están aumentados en los riñones obstruidos de los ratones WT

El análisis de los resultados del modelo experimental de UUO reflejó diferentes respuestas en cuanto a los niveles de expresión de los ligandos *Dlk1* y *Dlk2* en los ratones WT a los distintos tiempos estudiados. De este modo, se observó que no existían diferencias en la expresión génica de estos ligandos no canónicos en los riñones obstruidos en comparación con los riñones contralaterales tras 2 días de obstrucción. Sin embargo, sí se comprobó que existía un incremento significativo en los niveles de ambos factores a partir del día 5 de obstrucción, el cual se mantuvo elevado hasta los 14 días de obstrucción (**Figura 11**).

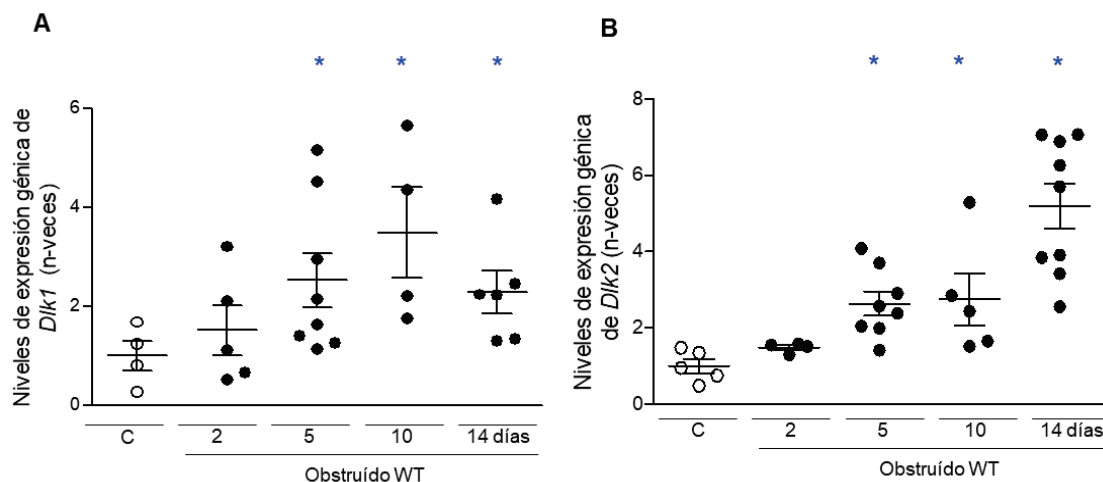


Figura 11: Los niveles de expresión génica de *Dlk1* y *Dlk2* se encontraron aumentados en los riñones obstruidos de los ratones WT a partir del día 5 de obstrucción. Ratones de la cepa 129/SvJ fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 2, 5, 10 y 14 días. (A) Niveles de ARNm por PCR a tiempo real de *Dlk1* y (B) *Dlk2*. C: Contralateral, WT: tipo salvaje. n=4-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralateral WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

2. La ausencia de *Dlk1* aumenta la presencia de células proinflamatorias en el riñón dañado por UUO, pero no induce cambios en la fibrosis

La evaluación de la morfología de las lesiones renales en cortes de biopsias de ambos grupos de ratones fue utilizada para determinar la progresión del daño renal durante los diferentes tiempos de UUO realizados (**Figura 12**). Teniendo en cuenta que los riñones contralaterales de los ratones WT y los deficientes en *Dlk1* no presentaron ningún daño (**Figura 12A**) se decidió no incluir estos valores en las gráficas. Sorprendentemente, el estudio del daño tubular, caracterizado por el nivel de dilatación de los túbulos renales y el nivel de atrofia de estos, no mostró diferencias significativas entre los riñones obstruidos de los ratones WT y los deficientes en *Dlk1* a ninguno de los días estudiados (**Figura 12C**). Además, la caracterización

del infiltrado inflamatorio, tanto perivascular como intersticial disperso por el tejido, reflejó una tendencia al alza en los animales deficientes en *Dlk1* comparados con los WT a los 2 días de obstrucción, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la evaluación del infiltrado a tiempos posteriores, sí que mostró un aumento significativo en los riñones de los ratones con delección en *Dlk1* a partir de los 5 días de obstrucción, el cual se mantuvo hasta el día 14 (**Figura 12D**). Además, cabe destacar que, mientras que en el día 14 de obstrucción los riñones obstruidos de los animales deficientes en *Dlk1* mostraron prominentes agregados perivasculars de células infiltrantes proinflamatorias, en el resto de los tiempos estudiados, así como en los ratones WT, el infiltrado inflamatorio se localizó de manera más intersticial por el tejido (**Figura 12B**).

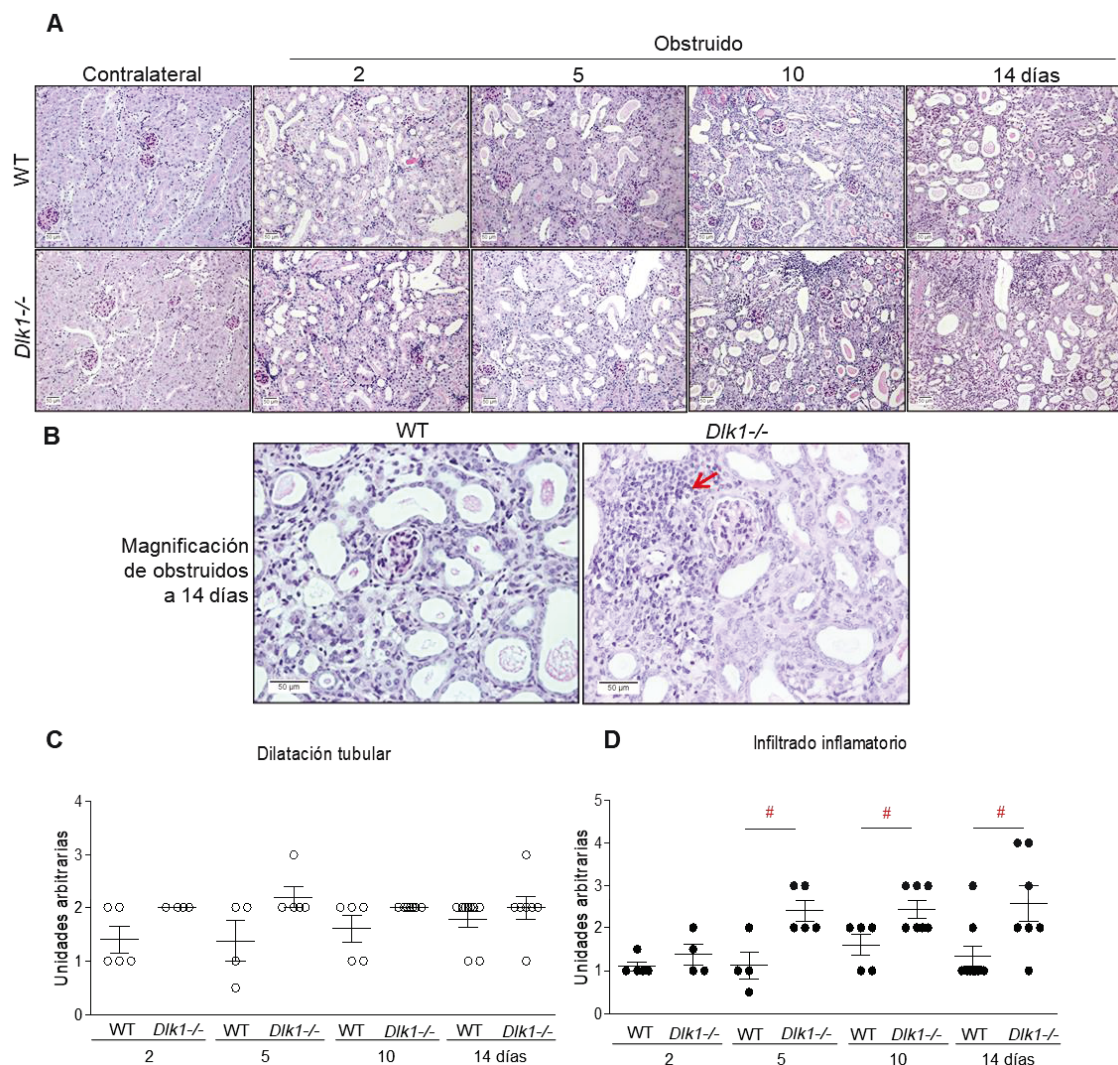


Figura 12: La tinción de PAS mostró aumento de células infiltrantes a partir de 5 días de obstrucción y agregados infiltrantes a los 14 días de obstrucción en ausencia de *Dlk1*. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 2, 5, 10 y 14 días. (A) Pictogramas representativos de la tinción de PAS. (B) Magnificación a 400X de WT y *Dlk1*^{-/-} a 14 días tras la obstrucción. La flecha roja indica la localización del infiltrado inflamatorio perivascular. (C) Cuantificación de dilatación tubular y (D) infiltrado inflamatorio a todos los tiempos. Barras de escala: 50µm. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=4-8 animales por grupo. Los datos se expresan en unidades arbitrarias y se representan como la media ± EEM. #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Los resultados de daño tubular obtenidos fueron confirmados con el análisis de los niveles de ARNm de los biomarcadores de daño renal *Kim-1* y *Lcn2*, que codifica para la proteína NGAL. De esta manera, ambos biomarcadores se encontraron aumentados en el daño renal por UUU a 14 días tras la obstrucción, pero no se hallaron diferencias significativas entre los riñones obstruidos de los ratones WT y deficientes en *Dlk1* (**Figura 13**).

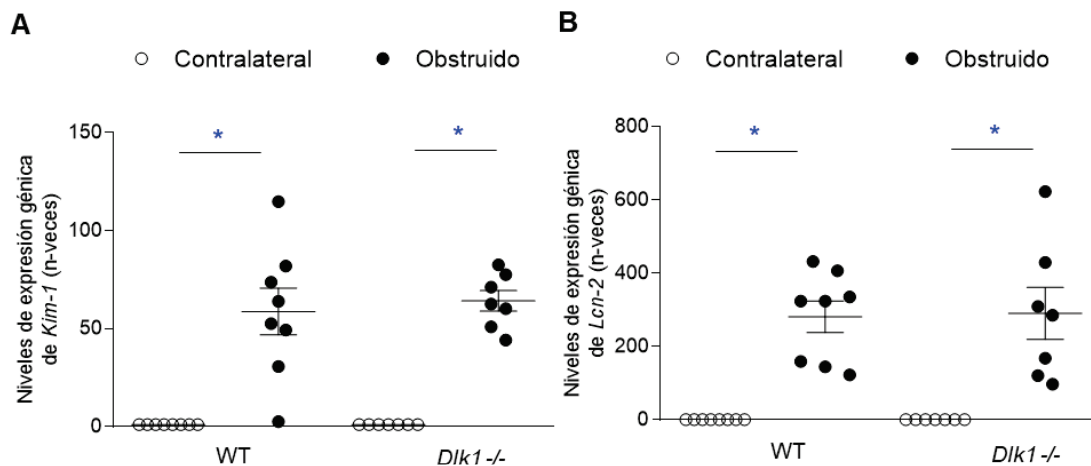


Figura 13: Los biomarcadores *Lcn2* y *Kim-1* no mostraron diferencias entre genotipos a los 14 días de obstrucción. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUU y los resultados estudiados a 14 días. Niveles de ARNm medidos por PCR a tiempo real de (A) *Kim-1* y (B) *Lcn2*. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=7-8 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a sus propios contralaterales y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Posteriormente, la exploración del grado de fibrosis tubulointersticial, llevada a cabo por un médico patólogo, dictaminó que no había diferencias en la acumulación de fibrosis tubulointersticial entre los grupos de ratones a los días estudiados. De este modo, aunque la tinción de tricrómico de Masson en el tiempo de mayor infiltrado inflamatorio, 14 días de obstrucción, mostró un aumento notable en la fibrosis tubulointerstitia en los riñones obstruidos al compararlos con los riñones contralaterales, no se observaron diferencias en los riñones obstruidos entre ambos genotipos (**Figura 14A**). Además, estos resultados fueron confirmados en el tejido renal midiendo los niveles de α -SMA, marcador de miofibroblastos y por tanto indicador de la presencia de fibrosis renal, ya que mostró niveles similares entre los riñones obstruidos de ambos genotipos (**Figura 14B, C**).

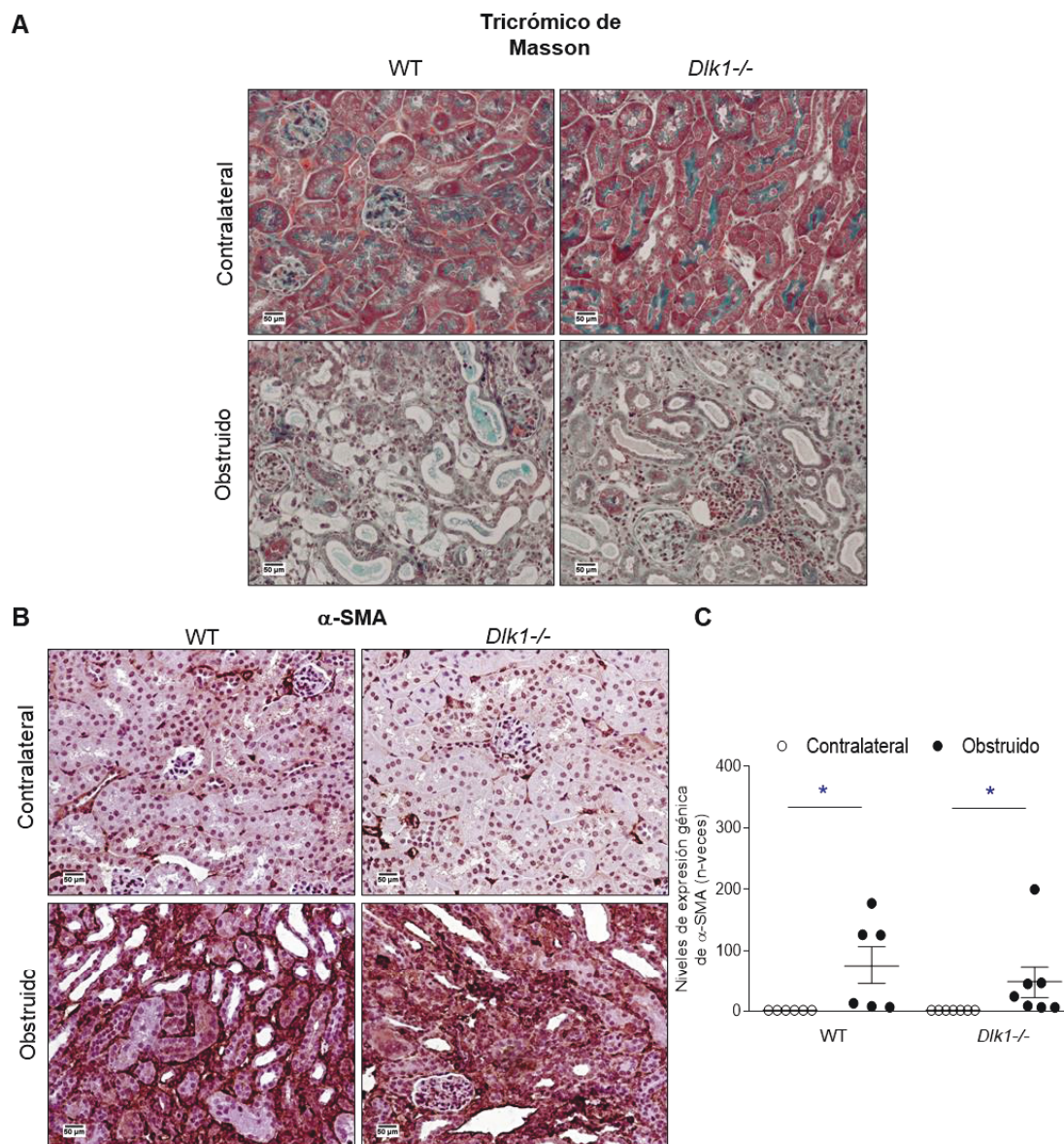


Figura 14: La ausencia de *Dlk1* no induce una mayor fibrosis en el UUO evaluado tras 14 días. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Pictogramas representativos de la tinción Tricrómico de Masson. (B) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de α -SMA. (C) Cuantificación de área teñida vs. área total de la expresión de α -SMA. Barras de escala: 50 μ m. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=5-6 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a sus propios contralaterales y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en el estudio de histología, la caracterización del infiltrado inflamatorio en los riñones se llevó a cabo tras 14 días de UUO. En primer lugar se estudió la presencia de células infiltrantes asociadas al marcador de macrófagos F4/80 (**Figura 15**). Los resultados de este análisis demostraron la presencia de macrófagos en los riñones obstruidos con respecto a los contralaterales de su propio grupo. Además, la comparativa de los riñones dañados entre los diferentes genotipos demostró que en los riñones de los ratones deficientes en *Dlk1* había un aumento significativo de la presencia de células F4/80 positivas, localizadas de manera diseminada por el tejido renal (**Figura 15**).

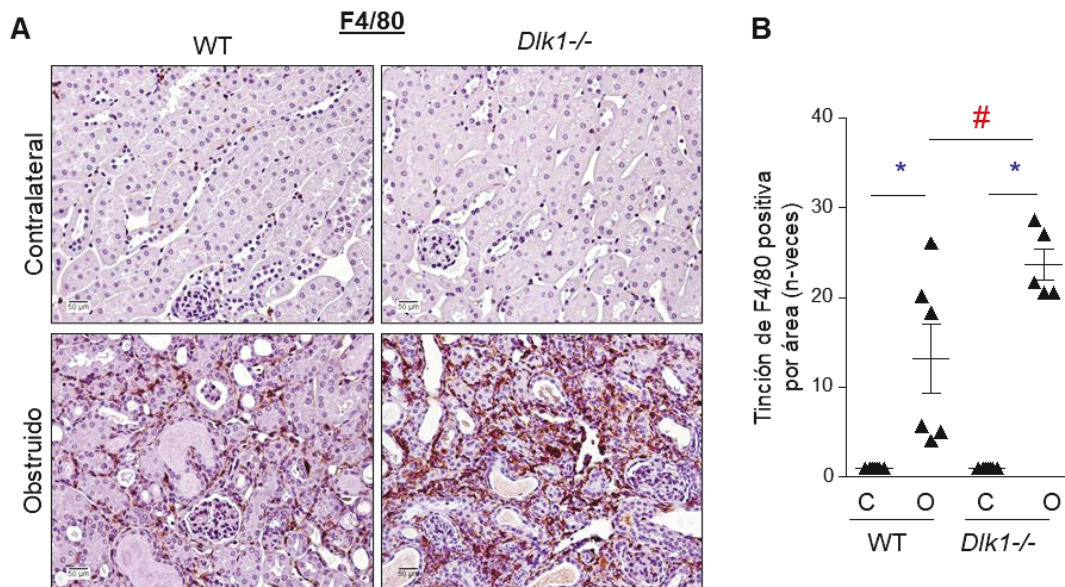


Figura 15: La delección de *Dlk1* exacerba el infiltrado inflamatorio intersticial de células F4/80 positivas. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Pictogramas representativos de la presencia de células F4/80 positivas y (B) su cuantificación por área vs área total. Barras de escala: 50 μ m. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. C: Contralateral, O: Obstruido. n=5-7 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Posteriormente se evaluaron los niveles del marcador propio de los neutrófilos, la mieloperoxidasa. En este caso los niveles de este marcador en los riñones obstruidos también se encontraban significativamente aumentados cuando se compararon con sus riñones contralaterales. Además, cuando se compararon los riñones dañados de los ratones WT con los que presentan la delección en *Dlk1*, se observó un incremento significativo en la presencia de neutrófilos en este último grupo, localizados tanto de manera diseminada por el tejido como a nivel perivascular (**Figura 16**).

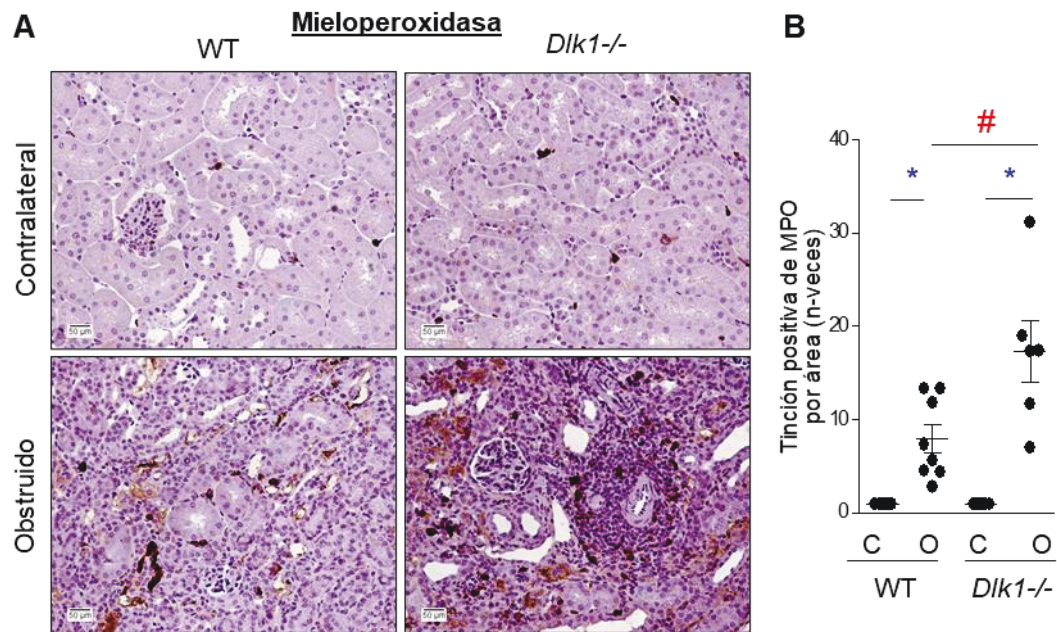


Figura 16: La delección de *Dlk1* exacerba el infiltrado inflamatorio de células positivas en mieloperoxidasa. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Pictogramas representativos de la presencia de células que liberan mieloperoxidasa y (B) su cuantificación por área vs área total. Barras de escala: 50 µm. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. C: Contralateral, O: Obstruido. n=6-8 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Para continuar con la caracterización del infiltrado inflamatorio, se estudió la presencia del CD3, marcador de linfocitos T, en el tejido renal. De manera similar a lo observado para macrófagos y neutrófilos, se detectó la presencia de este marcador en los riñones obstruidos de ambos genotipos (**Figura 17**). Asimismo, la presencia de células TCD3 positivas estaba muy incrementada en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1* con respecto a los riñones obstruidos de los ratones WT (**Figura 17**).

Posteriormente, se evaluó la presencia del marcador de linfocitos T cooperativos, el CD4, en el tejido renal. En este caso, también se encontró por un lado un aumento del marcador CD4 en los riñones obstruidos con respecto a sus contralaterales en ambos genotipos, así como una exacerbación en sus niveles en los riñones obstruidos de los ratones que presentan delección en *Dlk1* con respecto a los riñones obstruidos del grupo WT (**Figura 18**).

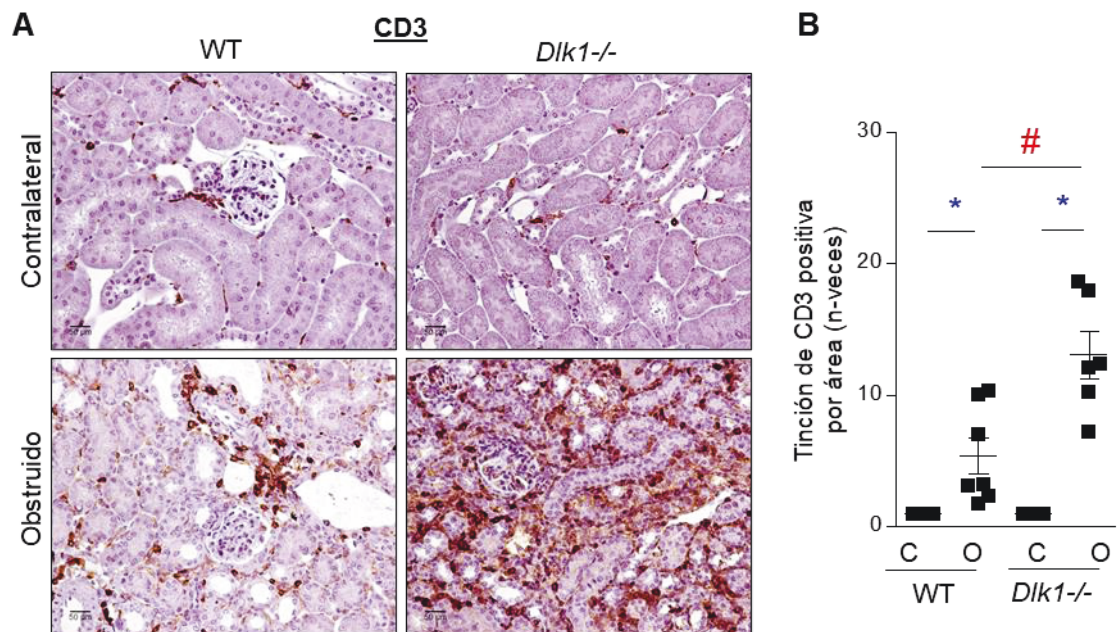


Figura 17: La delección de *Dlk1* exacerba el infiltrado inflamatorio de células TCD3 positivas. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Pictogramas representativos de la presencia de células CD3 positivas y (B) su cuantificación por área vs área total. Barras de escala: 50 µm. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. C: Contralateral, O: Obstruido. n=6-7 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

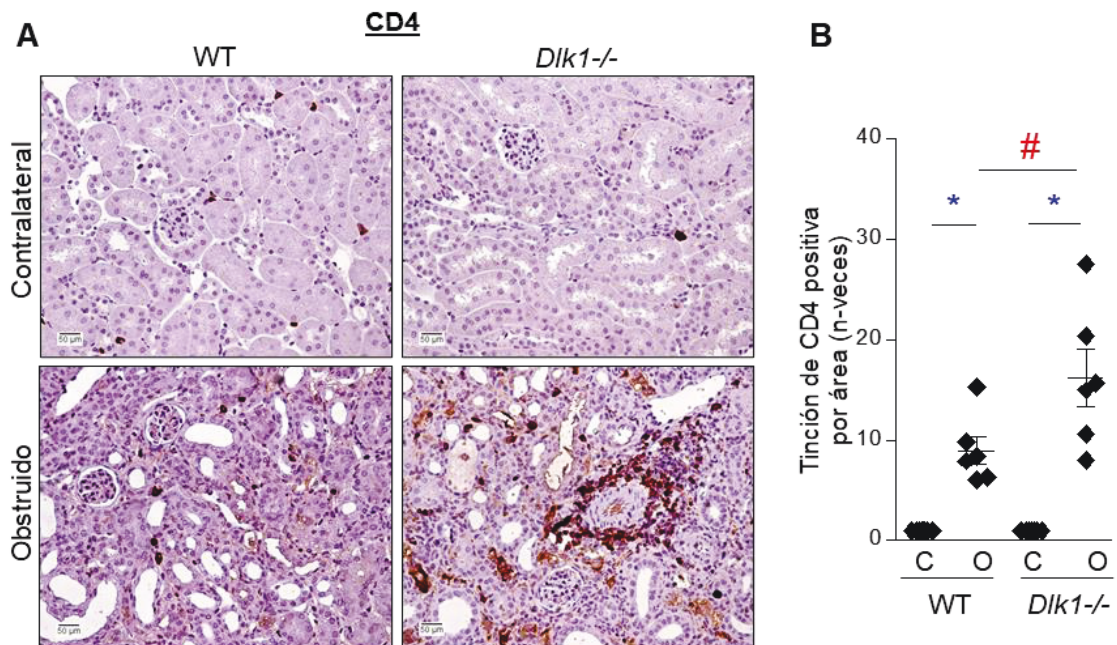


Figura 18: La delección de *Dlk1* exacerba el infiltrado inflamatorio de células TCD4 positivas. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Pictogramas representativos de la presencia de células T CD4 positivas y (B) su cuantificación por área vs área total. Barras de escala: 50 µm. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. C: Contralateral, O: Obstruido. n=6-7 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

3. La delección de *Dlk1* modula el estado de algunos de los componentes de la vía de señalización de NOTCH

3.1 La expresión de *Dlk2* se encuentra aumentada en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1*

El estudio de los niveles de ARNm del ligando *Dlk2* a los diferentes tiempos de UUO realizados, determinó un incremento en los riñones obstruidos de ambos genotipos comparados con los contralaterales WT a partir del día 5 de obstrucción. Además, este aumento fue significativamente mayor en los riñones obstruidos de los ratones deficientes en *Dlk1* que en los WT. Sin embargo, aunque en los siguientes tiempos estudiados también existían diferencias en los niveles de *Dlk2* entre los riñones obstruidos y los contralaterales WT, no se encontraron diferencias en los riñones dañados entre ambos genotipos (**Figura 19**).

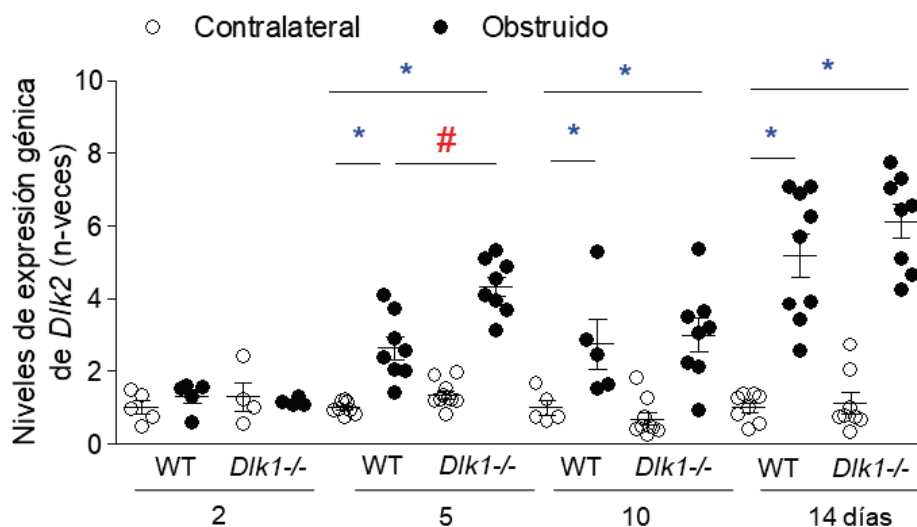


Figura 19: Los niveles de expresión génica de *Dlk2* se encontraron aumentados en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1* en el quinto día de obstrucción, pero volvieron a los niveles de los WT en los días posteriores. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 2, 5, 10 y 14 días. Niveles de ARNm por PCR a tiempo real de *Dlk2*. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficientes en el gen de *Dlk1*. n=4-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales WT, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

3.2 La expresión de Jagged-1 incrementa en los riñones obstruidos, pero no se modifica en ausencia de *Dlk1*

El estudio de los niveles génicos y proteicos del ligando canónico de la vía de señalización de NOTCH1, Jagged-1, a los diferentes tiempos de UO reflejó un incremento a partir del día 5 de obstrucción. De este modo, mientras que tras 2 días de obstrucción se observó un ligero aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm de *Jagged-1* en los riñones obstruidos con respecto a los contralaterales en el grupo de ratones WT, los riñones dañados y deficientes en *Dlk1* mostraron una tendencia al alza no significativa con respecto a los contralaterales (**Figura 20A**). Sin embargo, los niveles de ARNm de *Jagged-1* después de 14 días de obstrucción sí que mostraron un aumento significativo con respecto a los riñones contralaterales WT en ambos grupos (**Figura 20A**). Por otro lado, los resultados obtenidos en los estudios proteicos a los 5 días después de la obstrucción mostraron también un aumento significativo de los niveles de Jagged-1 en los riñones obstruidos con respecto a los riñones contralaterales WT en ambos grupos (**Figura 20B**). A pesar de todos estos resultados, no se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica total ni en los niveles de expresión génica del ligando Jagged-1 entre los riñones dañados de los ratones WT y los ratones con delección en *Dlk1* a estos tiempos estudiados (**Figura 20A, B**).

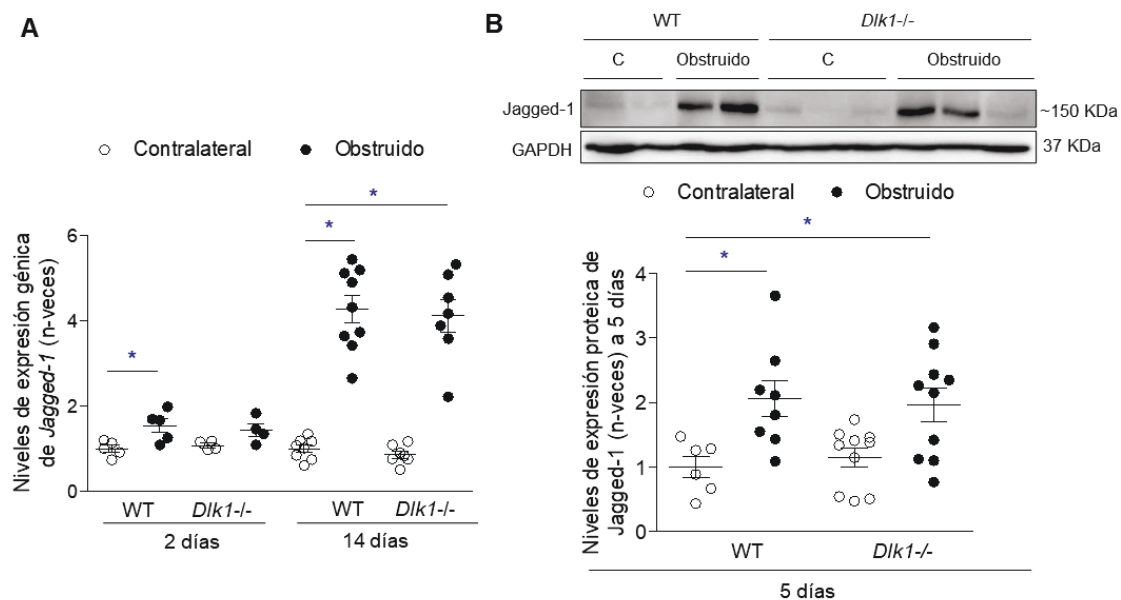


Figura 20: La delección de *Dlk1* no modificó los niveles del ligando canónico Jagged-1 a ninguno de los días evaluados tras el UUO. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 2, 5 días y 14 días. (A) Niveles de ARNm por PCR a tiempo real de *Jagged-1* a 2 y 14 días (B) Western blot representativo de los niveles proteicos de Jagged-1 (panel superior) y su cuantificación, normalizados con respecto a la GAPDH (panel inferior) a 5 días tras la obstrucción. C: Contralateral. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=4-10 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. contralaterales WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

3.3 La ausencia de *Dlk1* aumenta la activación de la vía de señalización de NOTCH1 en el riñón obstruido

Tras realizar el estudio de las lesiones renales, se procedió a la exploración de la activación de la vía de señalización de NOTCH1, mediante la evaluación de los niveles de la proteína N1ICD, en el modelo de UUO a 5 y a 14 días. El estudio de los valores proteicos de N1ICD en los extractos de proteína total tras 5 días de obstrucción mostró un aumento en la activación de la vía de NOTCH1 en los riñones obstruidos comparados con los contralaterales WT. A pesar de ello, no se observaron diferencias significativas entre los riñones obstruidos del grupo de ratones WT y los deficientes en *Dlk1* (**Figura 21A**). La cuantificación de los núcleos N1ICD positivos en cortes de tejido renal tampoco reflejó diferencias en la localización ni en la activación de esta molécula entre ambos genotipos a 5 días (**Figura 21B, C**). Por el contrario, el estudio tras 14 días de UUO, además de mostrar un aumento en los niveles de N1ICD en los extractos proteicos renales en los riñones obstruidos con respecto a los contralaterales WT, evidenció un aumento significativo de esta proteína en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1* con respecto a los WT (**Figura 22A**). El análisis inmunohistológico renal tras 14 días de obstrucción confirmó un aumento principalmente nuclear de N1ICD tanto en las células tubuloepiteliales como en las células infiltrantes de los riñones obstruidos de ambos genotipos (**Figura 22B, C**). De esta manera, el aumento fue significativamente mayor en el grupo de ratones deficientes en *Dlk1* al compararlos con los WT, y fue localizado principalmente en el infiltrado inflamatorio perivascular (**Figura 22B, C y D**).

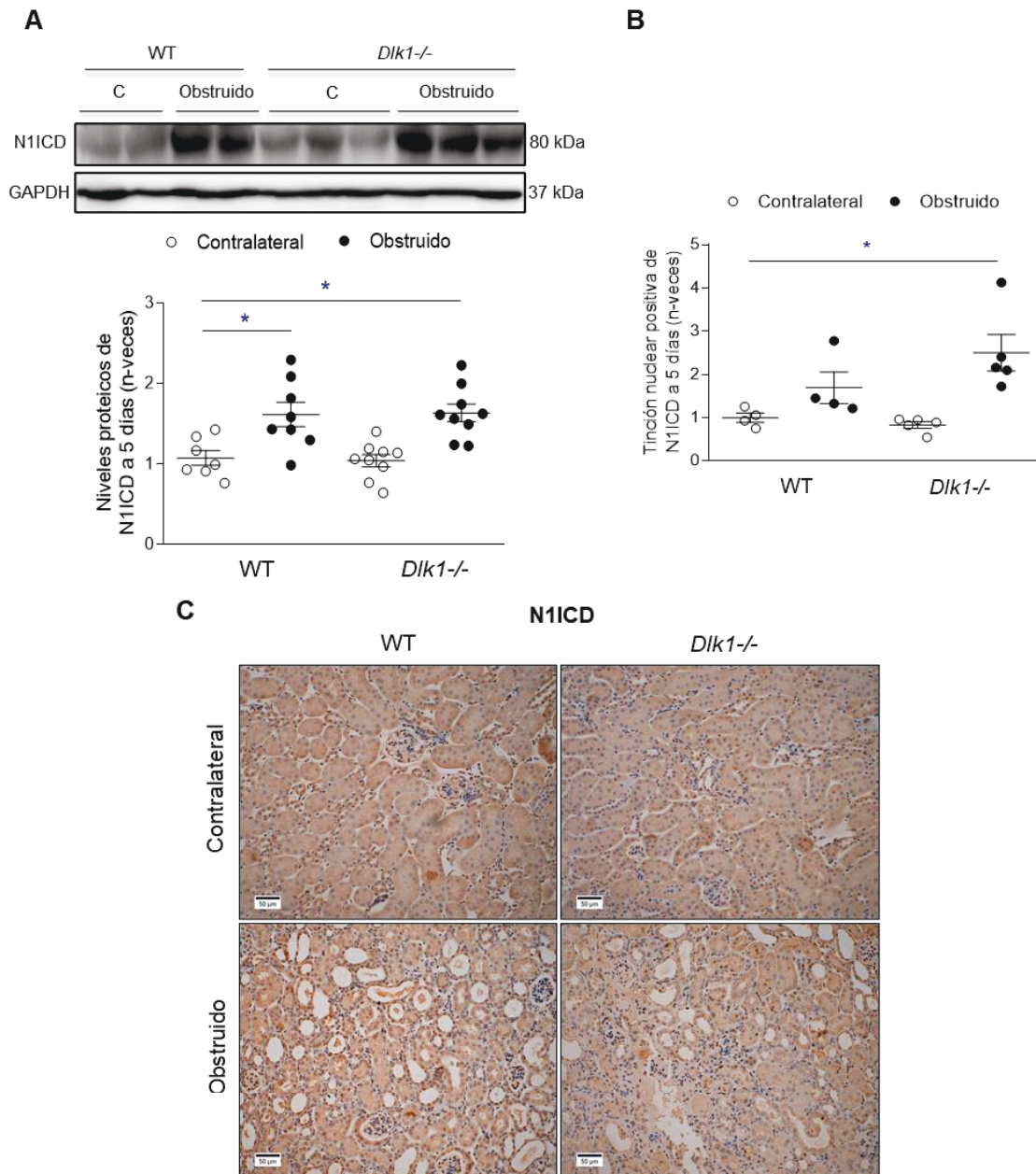


Figura 21: La delección de *Dlk1* no modificó los niveles de activación de la vía de señalización de NOTCH1 a 5 días de UUO. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 5 días. (A) Western blot representativo de la hibridación de las muestras con N1ICD y GAPDH como control de carga (panel superior) y cuantificación de N1ICD normalizada con los niveles de GAPDH (panel inferior). (B) Cuantificación de los núcleos positivos en N1ICD. (C) Pictogramas representativos de la inmunohistoquímica de N1ICD. Barras de escala: 50 μm. C: Contralateral. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=4-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. contralaterales WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

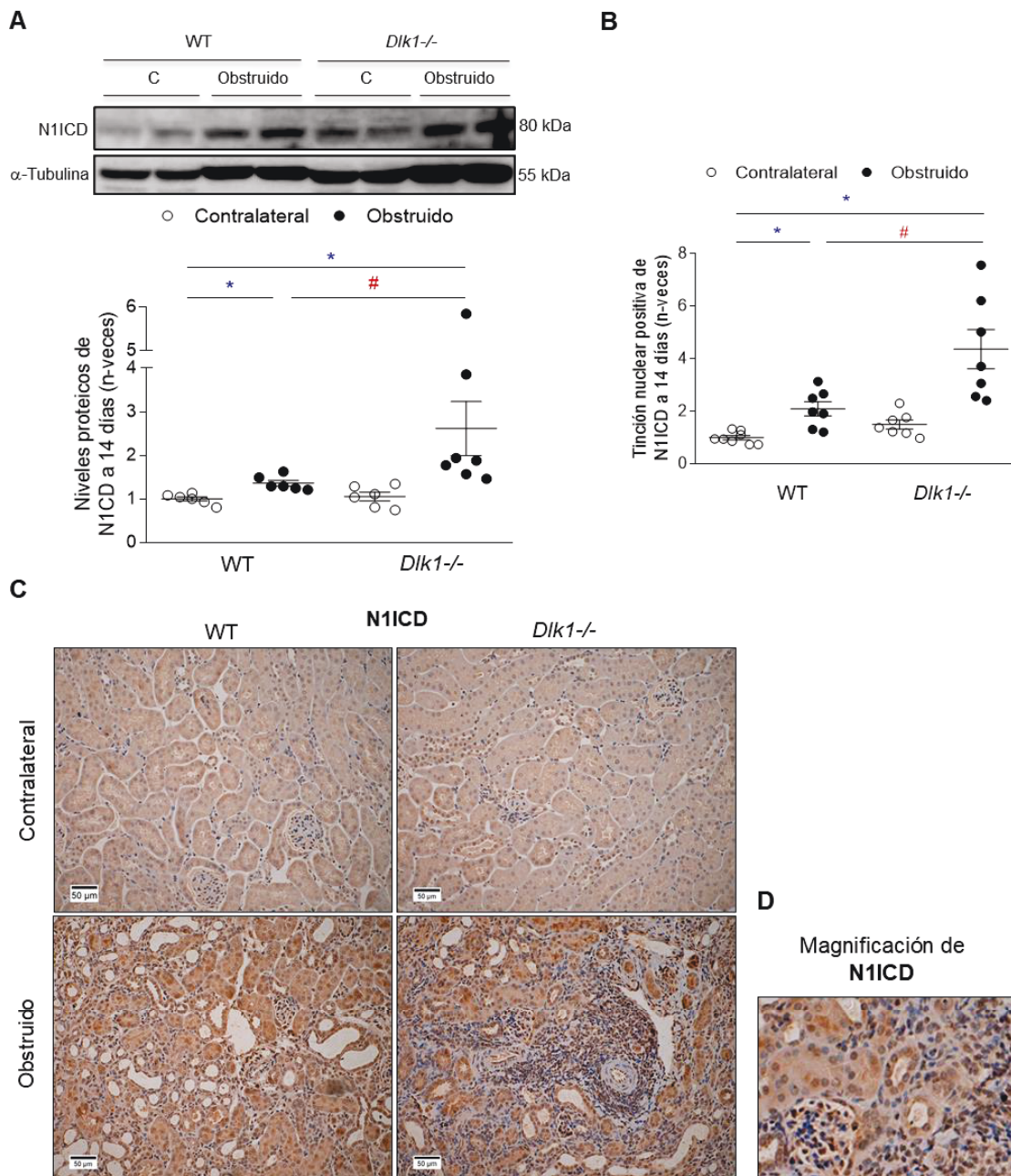


Figura 22: La vía de señalización de NOTCH1 se encontró sobreactivada en los ratones con delección en *Dlk1* tras 14 días de obstrucción. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Western blot representativo de la hibridación de las muestras con N1ICD y α -tubulina como control de carga (panel superior) y cuantificación N1ICD normalizada con los niveles de α -tubulina (panel inferior). (B) Cuantificación de los núcleos positivos en N1ICD por inmunohistoquímica. (C) Pictogramas representativos de la inmunohistoquímica de N1ICD. (D) Magnificación del riñón obstruido del *Dlk1*^{-/-}. Barras de escala: 50 μ m. C: Contralateral. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=6-7 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales WT, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

3.4 La delección de *Dlk1* promueve la disminución de los niveles proteicos del receptor NOTCH2, pero no de NOTCH3 ni de NOTCH4 en los riñones dañados

La evaluación de los niveles de expresión del receptor *Notch2* determinó en primer lugar un aumento en su expresión a nivel génico en los riñones obstruidos con respecto a los contralaterales WT después 14 días de obstrucción, aunque no se hallaron diferencias significativas entre riñones obstruidos de los ratones WT y los deficientes en *Dlk1* (**Figura 23A**). Sin embargo, la evaluación de los niveles de este receptor a nivel proteico sí que mostró diferencias entre ambos grupos. De este modo, se detectó una marcada disminución de NOTCH2 tras 14 días de obstrucción en la ausencia de *Dlk1*, cuyos niveles fueron similares a los encontrados en los riñones contralaterales WT (**Figura 23B**).

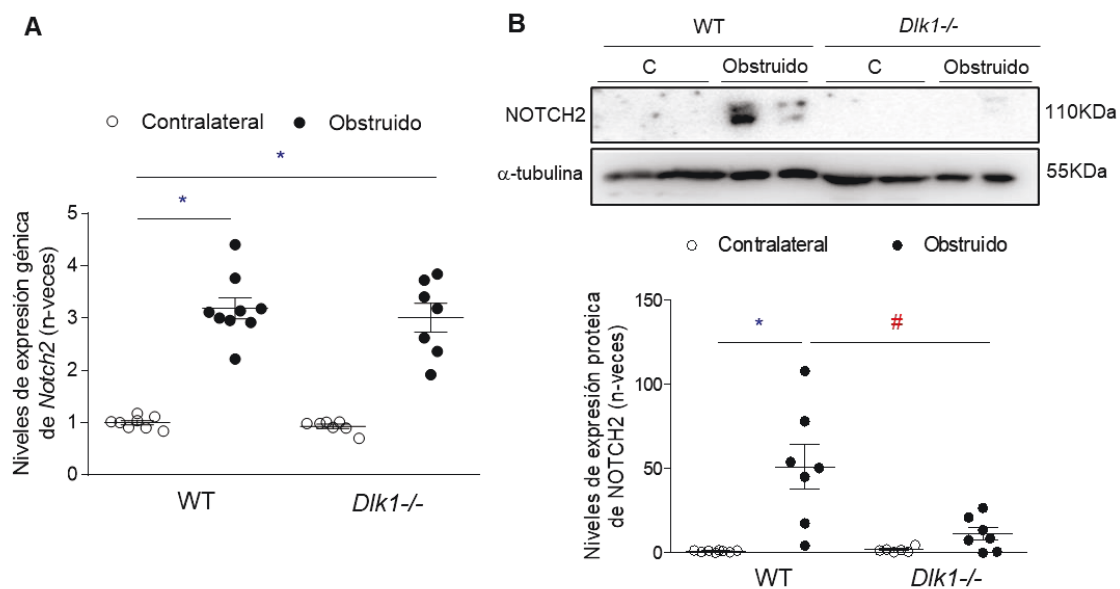


Figura 23: Los niveles del receptor NOTCH2 a nivel proteico se encuentran disminuidos en la ausencia de *Dlk1* tras 14 días de obstrucción. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Niveles de ARNm por PCR a tiempo real de *Notch2*. (B) Western blot representativo de los niveles proteicos del receptor NOTCH2 (panel superior) y su cuantificación, normalizado frente a α -tubulina (panel inferior) a 14 días tras la obstrucción. C: Contralateral. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=6-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales WT, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Por otro lado, la exploración de la expresión del receptor de *Notch3* a nivel génico tras 14 días de obstrucción reflejó en primer lugar un incremento en los niveles de este receptor en los riñones obstruidos respecto a los contralaterales en ambos genotipos (**Figura 24A**). Sin embargo, la comparativa de los niveles de *Notch3* entre los riñones obstruidos de ambos grupos puso de manifiesto una disminución en la ausencia de *Dlk1* (**Figura 24A**). A continuación, la se realizó la evaluación de la expresión de NOTCH3 analizando su localización directamente en secciones renales procesados tras 14 días de UUO (**Figura 24B, C**). El análisis de este estudio reveló por un lado que la vía de señalización de NOTCH3 se estaba activando, puesto que se encontró localización de NOTCH3 en el núcleo de las células tubuloepteliales y de las células

RESULTADOS

inflamatorias infiltrantes, y por otro, que existía un aumento en su expresión, determinado por su presencia en el citoplasma tubular en los riñones obstruidos de ambos genotipos (**Figura 24C, D**). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el nivel de activación ni de expresión de NOTCH3 a nivel proteico al comparar los riñones de ambos genotipos (**Figura 24C, D**).

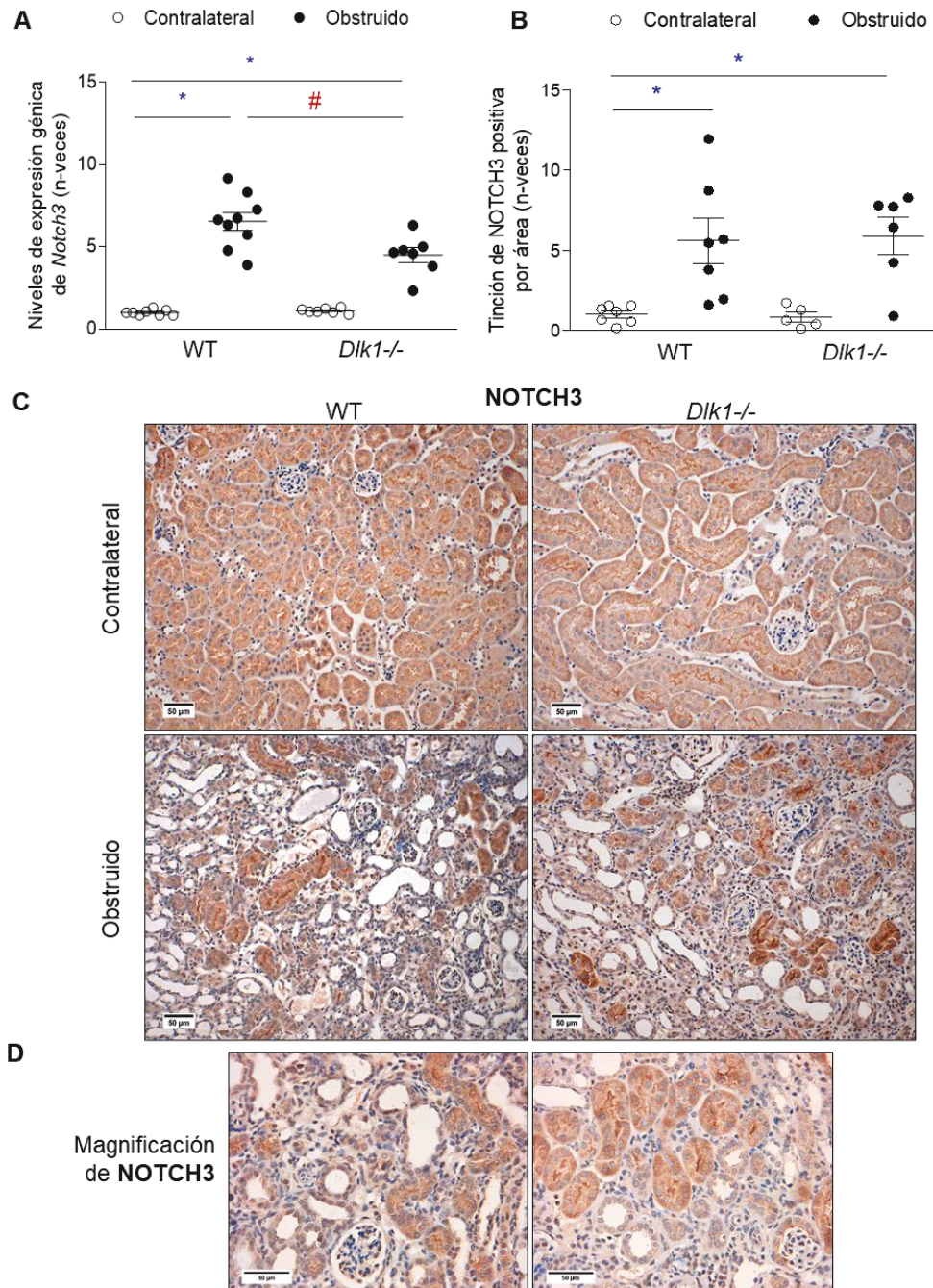


Figura 24: La expresión y activación de NOTCH3 no se modularon en la ausencia de *Dlk1* tras 14 días de obstrucción. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Niveles de ARNm por PCR a tiempo real de *Notch3*. (B) Cuantificación del área teñida vs el área total de la inmunohistoquímica de NOTCH3. (C) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de NOTCH3 y (D) aumento a 400X de los riñones obstruidos de ambos genotipos. Barras de escala: 50 μ m. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=6-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales WT, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Para finalizar el estudio de los receptores de NOTCH, se midieron los niveles de expresión génica y proteica de NOTCH4. En este caso, tanto los riñones obstruidos de los ratones WT como los de los ratones con delección en el gen de *Dlk1*, mostraron aumento de la expresión génica y proteica del receptor de NOTCH4 cuando se compararon con los riñones contralaterales (Figura 25). Asimismo, los riñones obstruidos de los ratones deficientes en *Dlk1* mostraron una disminución significativa de los niveles de ARNm de dicho receptor con respecto a los riñones dañados del grupo WT (Figura 25A). Sin embargo, aunque a nivel proteico también se observó una tendencia en la disminución de los niveles proteicos totales de NOTCH4 en ausencia de *Dlk1* frente a los ratones WT, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 25B).

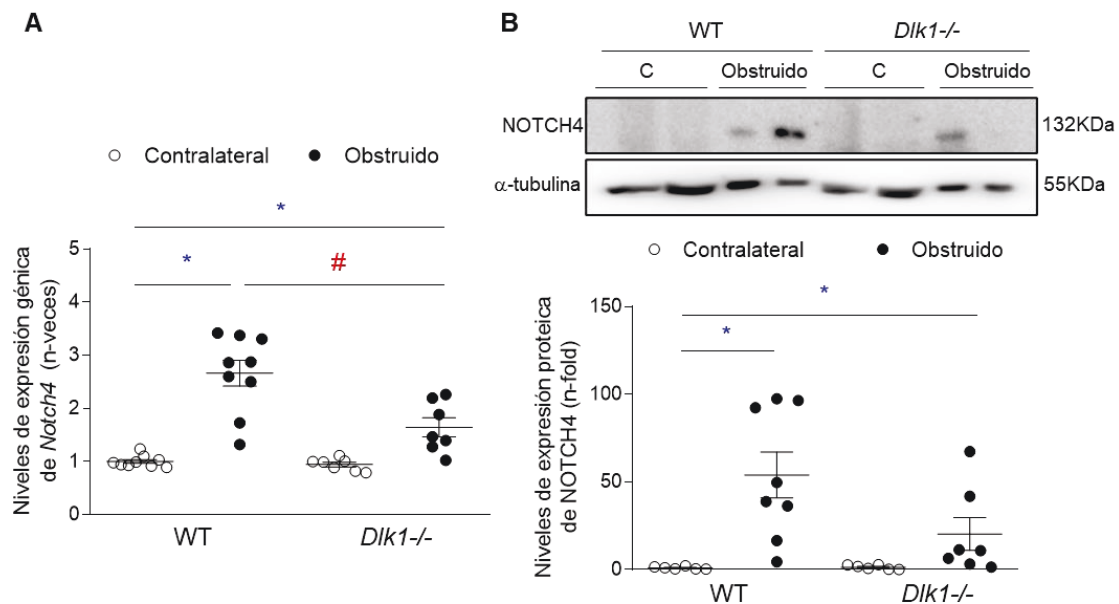


Figura 25: La ausencia de *Dlk1* no desregula la expresión del receptor NOTCH4. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Niveles de ARNm por PCR a tiempo real de *Notch4*. (B) Western blot representativo de los niveles proteicos del receptor NOTCH4 (panel superior) y su cuantificación normalizada frente a α -tubulina (panel inferior). C: Contralateral. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs. contralaterales WT, # $p < 0,05$ vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

3.5 La ausencia de *Dlk1* aumenta la expresión de *Hey-1* en los riñones dañados, pero no la de *Hes-1*.

Para finalizar con el estudio de la vía de señalización de NOTCH1, se evaluaron los niveles de expresión génica de los genes efectores de la vía, *Hes-1* y *Hey-1* a todos los tiempos de UUO en los ratones WT y los deficientes en *Dlk1* (**Figura 26**). La evaluación de la expresión de ARNm de *Hes-1* tras 2 días de obstrucción determinó la presencia de niveles similares en los riñones obstruidos y en los contralaterales en ambos genotipos. En cambio, a partir del día 5 de obstrucción y hasta el día 14, se observó un incremento en la expresión de *Hes-1* en los riñones dañados con respecto a los contralaterales WT en ambos grupos, que además no mostró diferencias significativas al comparar los riñones obstruidos WT con los que presentan la delección en *Dlk1* a ninguno de estos tiempos (**Figura 26A**). Por otra parte, al analizar los resultados obtenidos para el gen de *Hey-1*, se detectó un ligero aumento no significativo en los niveles de ARNm de este efector tras 2 días de obstrucción en los ratones deficientes en *Dlk1*, tanto en los riñones obstruidos como en los contralaterales (**Figura 26B**). Notablemente, al estudiar los niveles de expresión en el día 5 de obstrucción, se encontró una sobreexpresión de este gen en la ausencia de *Dlk1* en comparación con los no modificados genéticamente. A pesar de ello, este incremento se igualó entre genotipos en los riñones obstruidos en los días posteriores de estudio (**Figura 26B**).

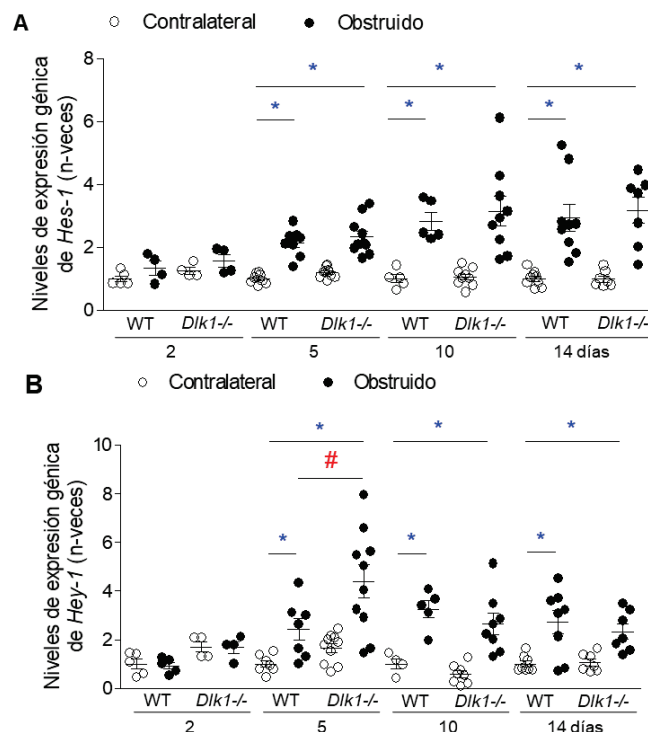


Figura 26: Los niveles de expresión génica de *Hey-1* se encontraron aumentados en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1* en el quinto día de obstrucción, pero no se encontraron cambios en el efector *Hes-1* entre ambos genotipos en los días estudiados. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 2, 5, 10 y 14 días. Niveles de ARNm por PCR a tiempo real de *Hes-1* (A) y *Hey-1* (B). WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=4-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a la media de los contralaterales WT y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. contralaterales WT, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

4. Estudios de mecanismos moleculares y celulares asociados al aumento de la inflamación renal en la ausencia de *Dlk1*

4.1 La delección de *Dlk1* no aumenta la activación de la vía clásica de señalización de NF- κ B en el daño renal

El estudio de la vía de señalización clásica de NF- κ B se realizó evaluando los niveles y el estado de activación de varias proteínas implicadas en la vía tras 14 días de UUO. En primer lugar, el análisis de los niveles proteicos citosólicos de I κ B α en estado fosforilado mostró un incremento en los riñones obstruidos con respecto a sus contralaterales en ambos genotipos (**Figura 27**). En la posterior comparativa de los riñones obstruidos entre los diferentes grupos de estudio se encontró una tendencia al alza en la fosforilación de I κ B α en ausencia de *Dlk1*, aunque los cambios no fueron estadísticamente significativos (**Figura 27A, C**). Por otro lado, aunque la exploración de los niveles nucleares de p65 mostró un aumento en los riñones dañados con respecto a los contralaterales, no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de p65 nuclear de los riñones obstruidos frente a los WT (**Figura 27A, B**).

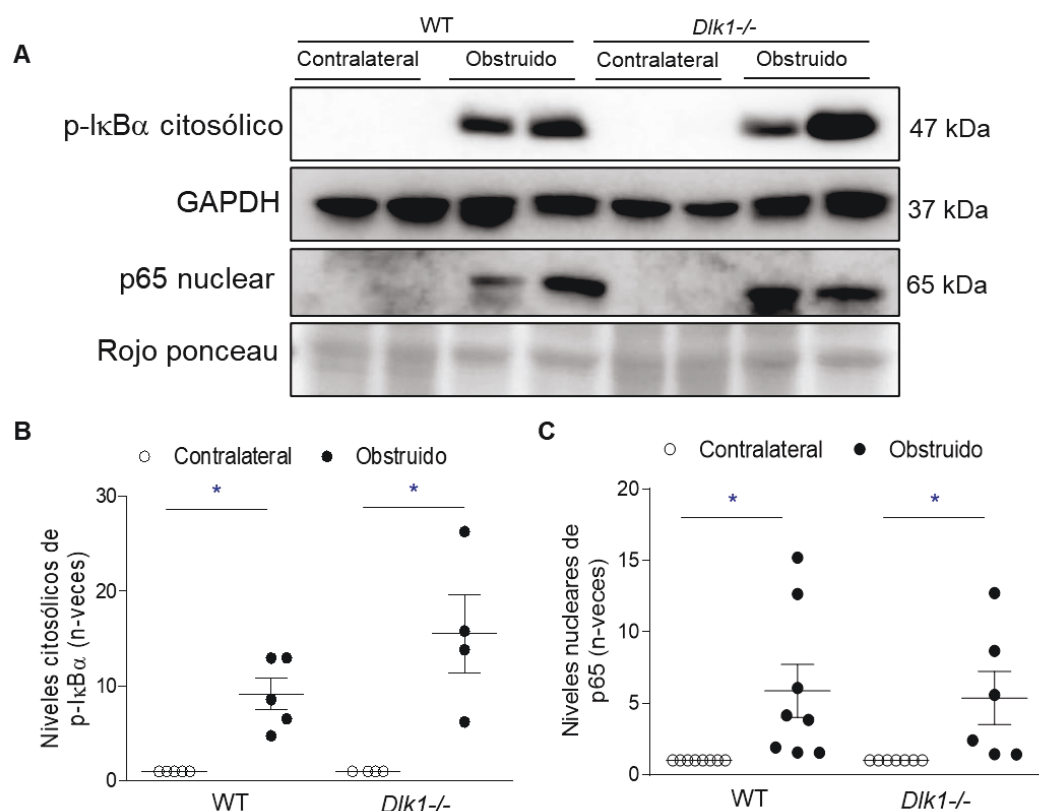


Figura 27: La delección de *Dlk1* no produce cambios en la activación de la vía de señalización de NF- κ B a 14 días tras la obstrucción. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Western blot representativo de la fosforilación de I κ B α citosólico y del p65 nuclear. (B) Cuantificación de los niveles citosólicos de p-I κ B α normalizado frente a GAPDH y (C) Cuantificación de los niveles nucleares de p65 normalizado frente al rojo ponceau. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=4-8 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

4.1.1 La ausencia de *Dlk1* incrementa los niveles de la citoquina proinflamatoria *Ccl-2* en los riñones sometidos a UUO a tiempos largos

La subsecuente exploración de la respuesta inflamatoria se llevó a cabo evaluando diversas citoquinas proinflamatorias quimioatrayentes relacionadas con la vía de señalización de NF- κ B. El análisis de los niveles de expresión de ARNm de las quimioquinas RANTES/CCL-5 y CXCL10 y de la citoquina TNF- α tras 14 días de UUO dictaminó que todas ellas se encontraban incrementadas en los riñones obstruidos frente a sus contralaterales en ambos grupos (**Figura 28**). Sin embargo, la ausencia de *Dlk1* no moduló los niveles de estos factores al comparar los riñones obstruidos con los de los ratones WT (**Figura 28**).

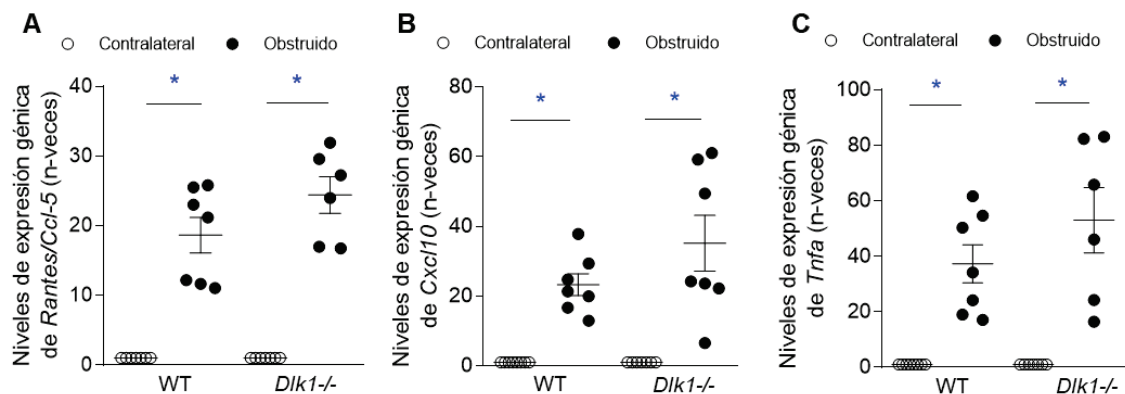


Figura 28: La delección de *Dlk1* no modifica la expresión de varias citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. Niveles de ARNm medidas por PCR a tiempo real de (A) *Rantes/Ccl-5*, (B) *Cxcl10* y (C) *Tnfa* (que da lugar a la proteína de TNF- α). WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. C: Contralateral, O: Obstruido. n=6-7 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

El estudio posterior de los niveles de ARNm de la quimioquina proinflamatoria CCL-2/MCP-1 puso de manifiesto un aumento en la expresión génica de este factor en los riñones obstruidos con respecto a sus contralaterales en ambos genotipos y a los diferentes tiempos de estudio 2, 5, 10 y 14 días tras el UUO. El análisis comparativo entre los riñones obstruidos del grupo WT y del grupo deficiente en *Dlk1* determinó la existencia de un aumento significativo en los niveles génicos de *Ccl-2* en este último grupo tras 10 y 14 días después del UUO (**Figura 29**).

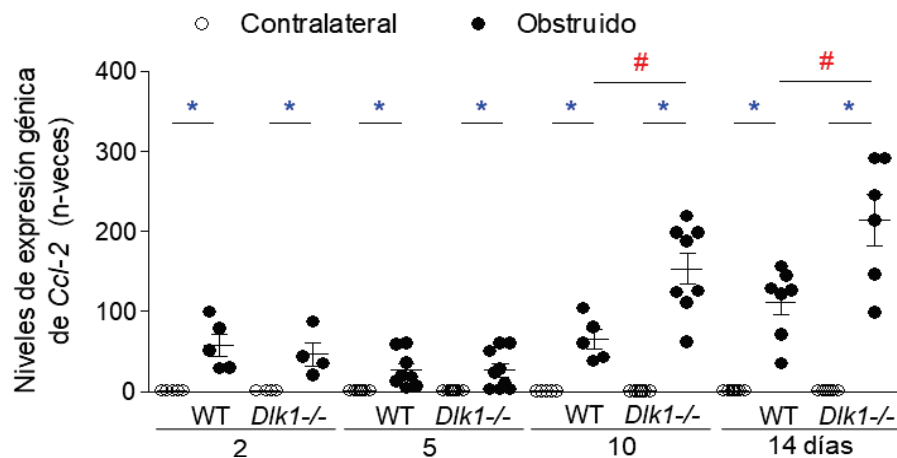


Figura 29: La delección de *Dlk1* provoca un incremento en los niveles génicos de *Ccl-2* a partir del décimo día de UUO. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 2, 5, 10 y 14 días. Se estudiaron los niveles de ARNm medidos por PCR a tiempo real del gen de *Ccl-2* que da lugar a la proteína MCP-1. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=4-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

El análisis de los niveles de otras citoquinas reguladas por la vía de señalización alternativa de NF- κ B, como son *Ccl-19* y *Ccl-21* tras 14 días de UUO, mostró un incremento de ambas citoquinas en los riñones obstruidos de los dos grupos frente a sus riñones contralaterales (Figura 30). No obstante, al igual que se observó con el resto de las citoquinas, exceptuando *Ccl-2*, no se encontraron diferencias en la expresión génica de *Ccl-19* y *Ccl-21* entre los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1* y los ratones WT (Figura 30).

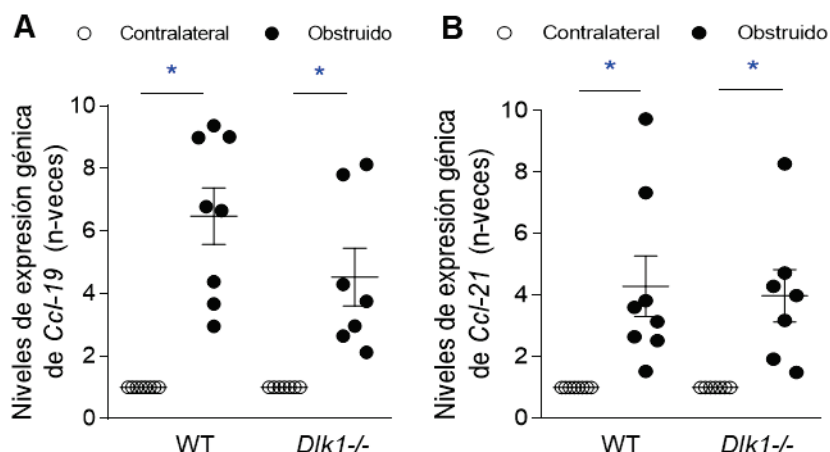


Figura 30: No se encontraron modificaciones en los niveles de expresión génica de los efectores de la vía de señalización alternativa de NF- κ B. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. Se estudiaron los niveles de ARNm medidos por PCR a tiempo real del gen de (A) *Ccl-19* y (B) *Ccl-21*. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. C: Contralateral, O: Obstruido. n=7-8 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales, #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

4.2 La delección de *Dlk1* indujo un aumento del infiltrado renal de células liberadoras de IL-17A en los riñones obstruidos.

La exploración de la respuesta inmunológica Th17 a nivel renal se llevó a cabo evaluando en un primer lugar los niveles de la citoquina efectora IL-17A en secciones de los riñones obstruidos de los ratones WT y los deficientes en *Dlk1* tras 14 días de UUO. De esta manera, se observó la presencia de IL-17A en los riñones dañados en ambos genotipos, en los cuales se encontraron niveles significativamente mayores en los riñones obstruidos con delección en el gen de *Dlk1* (Figura 31).

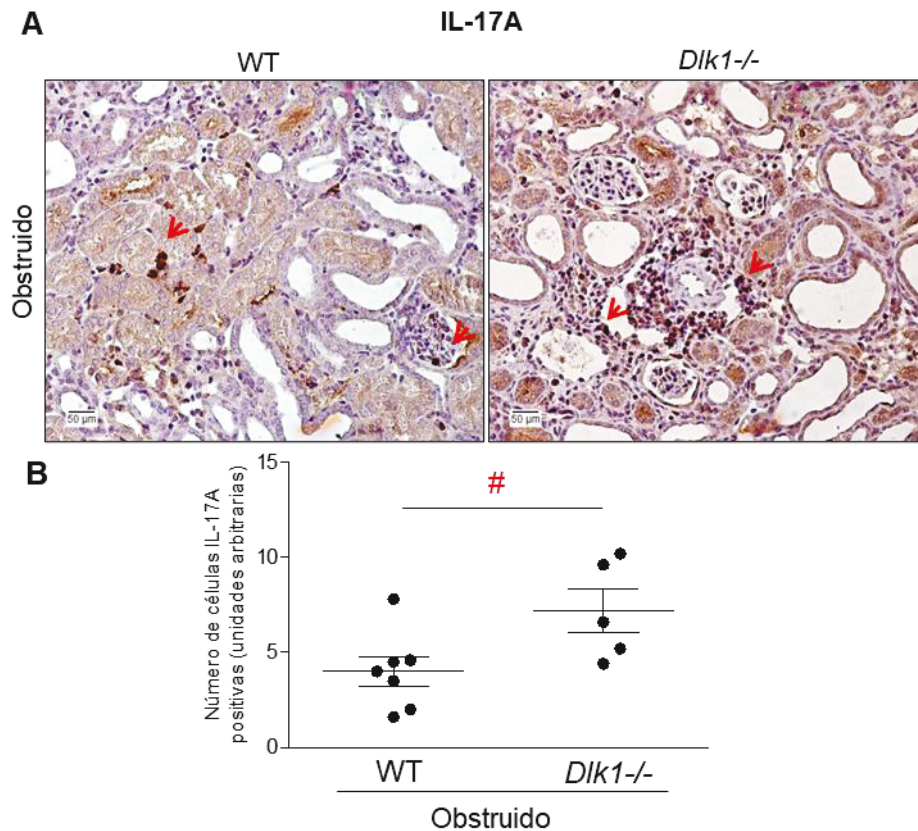


Figura 31: La delección de *Dlk1* aumenta la presencia de la IL-17A en los riñones obstruidos tras 14 días de UUO. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Pictogramas representativos de la inmunohistoquímica de la IL-17A y (B) su cuantificación. Las flechas rojas indican la presencia de células IL17A+. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. Barras de escala: 50 μ m. n=5-7 animales por grupo. Los datos se expresan como unidades arbitrarias y se representan como la media \pm EEM. #p<0,05 vs. obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Posteriormente, se exploraron los niveles de expresión a nivel renal del factor de transcripción principal de los linfocitos Th17, el ROR γ t, en los extractos nucleares obtenidos tras 14 días de UUO. Este estudio reflejó un aumento de expresión proteica nuclear de ROR γ t en los riñones obstruidos de ambos genotipos, el cual se encontró significativamente exacerbado en la ausencia de *Dlk1* (Figura 32).

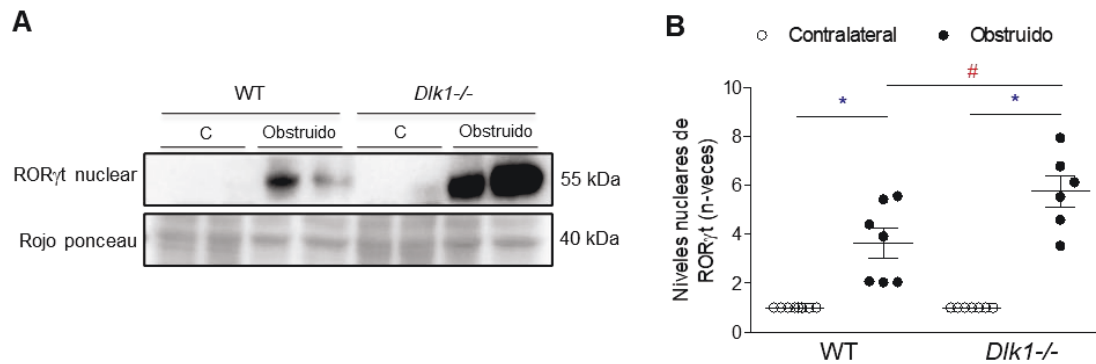


Figura 32: La ausencia de *Dlk1* exacerba la expresión proteica del factor de transcripción nuclear de ROR γ t tras 14 días de UUO. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Western blot representativo de los niveles nucleares del factor de transcripción ROR γ t y (B) su cuantificación. C: Contralateral. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=6-7 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales, #p<0,05 vs obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Por último, se determinaron los niveles y la localización nuclear del factor de transcripción secundario de los linfocitos Th17, STAT3, en la histología renal. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la expresión y localización nuclear de STAT3 en los riñones obstruidos en ambos genotipos al compararlos con sus respectivos riñones contralaterales. Además, también se observó un incremento significativo en los niveles nucleares de STAT3 en los riñones dañados de los ratones deficientes en *Dlk1* (Figura 33).

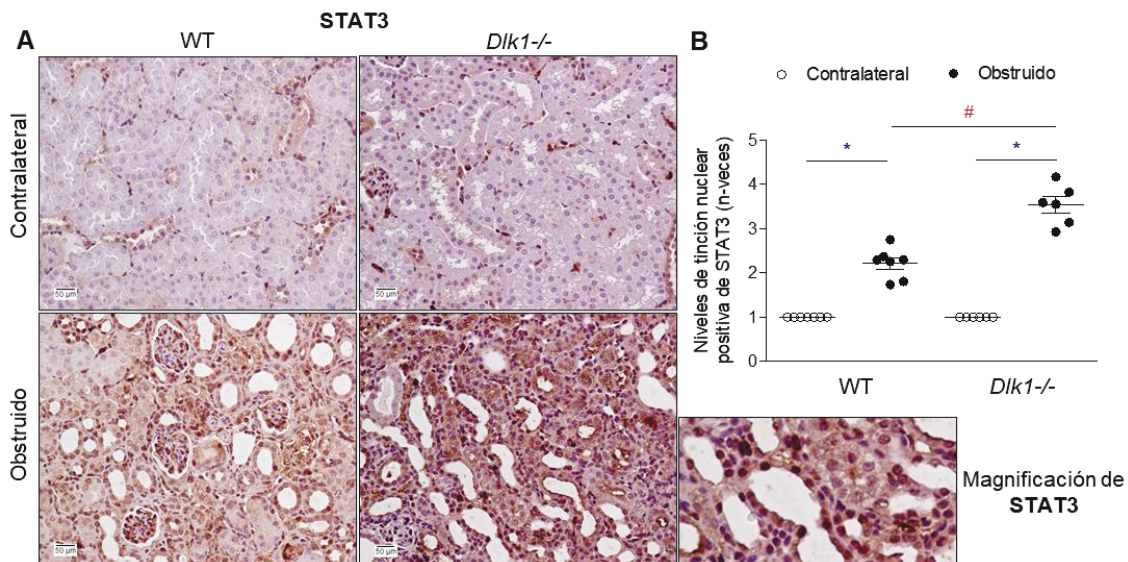


Figura 33: La ausencia de *Dlk1* exacerba la expresión proteica nuclear del factor de transcripción de STAT3 tras 14 días de UUO. Ratones de la cepa 129/SvJ sin y con delección en el gen de *Dlk1* fueron sometidos a UUO y los resultados estudiados a 14 días. (A) Pictogramas representativos de la inmunohistoquímica de la STAT3 y (B) su cuantificación. (C) Magnificación de STAT3 nuclear en los riñones obstruidos deficientes en DLK1. WT: tipo salvaje. *Dlk1*^{-/-}: deficiente en el gen de *Dlk1*. n=6-7 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a su propio contralateral y se representan como la media \pm EEM. *p<0,05 vs. contralaterales propios, #p<0,05 vs obstruidos WT. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

5. La inhibición de la activación de la vía de señalización de NOTCH disminuye la respuesta inmunológica Th17

En concordancia con los resultados anteriores obtenidos, el tratamiento preventivo con un inhibidor de la activación de NOTCH, el DAPT, redujo la activación de la respuesta Th17 tras 5 días de UUO. De esta manera, se comprobó en un primer lugar que el aumento en los niveles de IL-17A observado en los riñones dañados cuando se compararon con los riñones *sham* estaba significativamente disminuidos en el grupo de ratones tratados con DAPT (**Figura 34**).

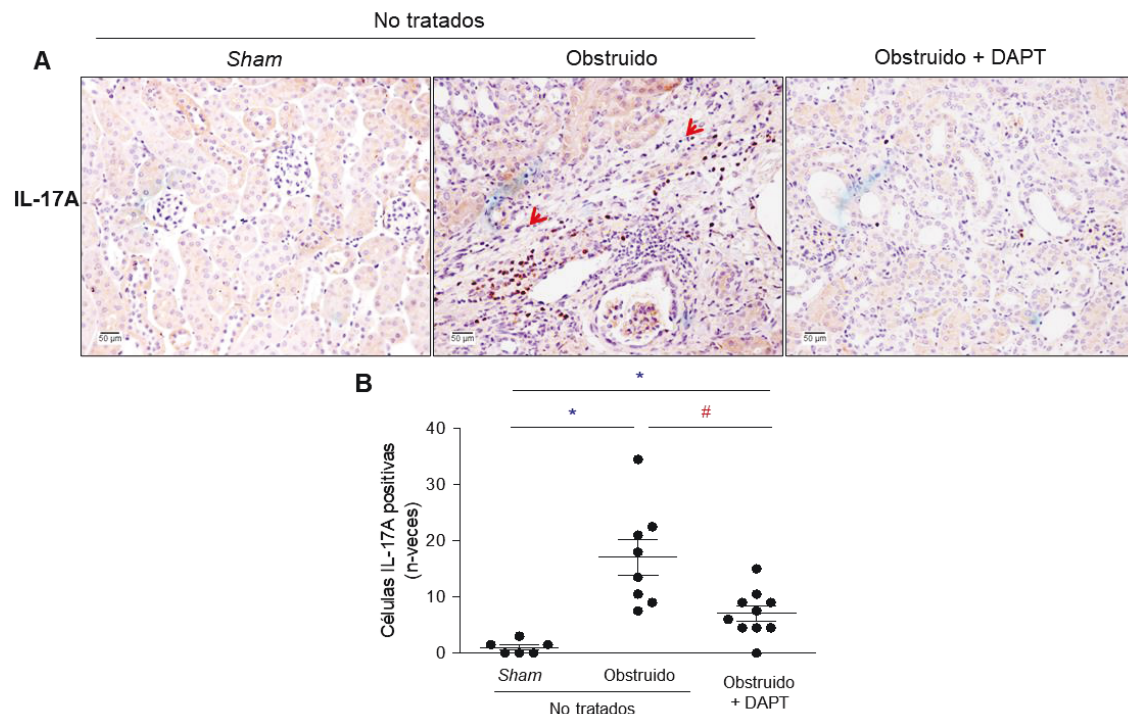


Figura 34: La inhibición de la activación de la vía de señalización de NOTCH disminuye la infiltración de IL-17A a los 5 días de UUO. Ratones de la cepa C57BL/6 recibieron una dosis de 100µg/ratón/día y fueron sometidos a UUO y los resultados analizados a los 5 días tras la obstrucción. (A) Pictogramas representativos de la inmunohistoquímica de la IL-17A y (B) su cuantificación. Barras de escala: 50 µm. n=6-10 animales por grupo. Los datos se expresan como n-voces con respecto al *sham* y se representan como la media ± EEM. *p<0,05 vs. *sham*, #p<0,05 vs obstruidos no tratados. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Del mismo modo, los niveles proteicos totales del factor de transcripción RORγt, que se encontraron aumentados en los riñones dañados tras 5 días de UUO, mostraban niveles similares a los observados en los riñones contralaterales en el grupo tratado de manera preventiva con DAPT (**Figura 35**).

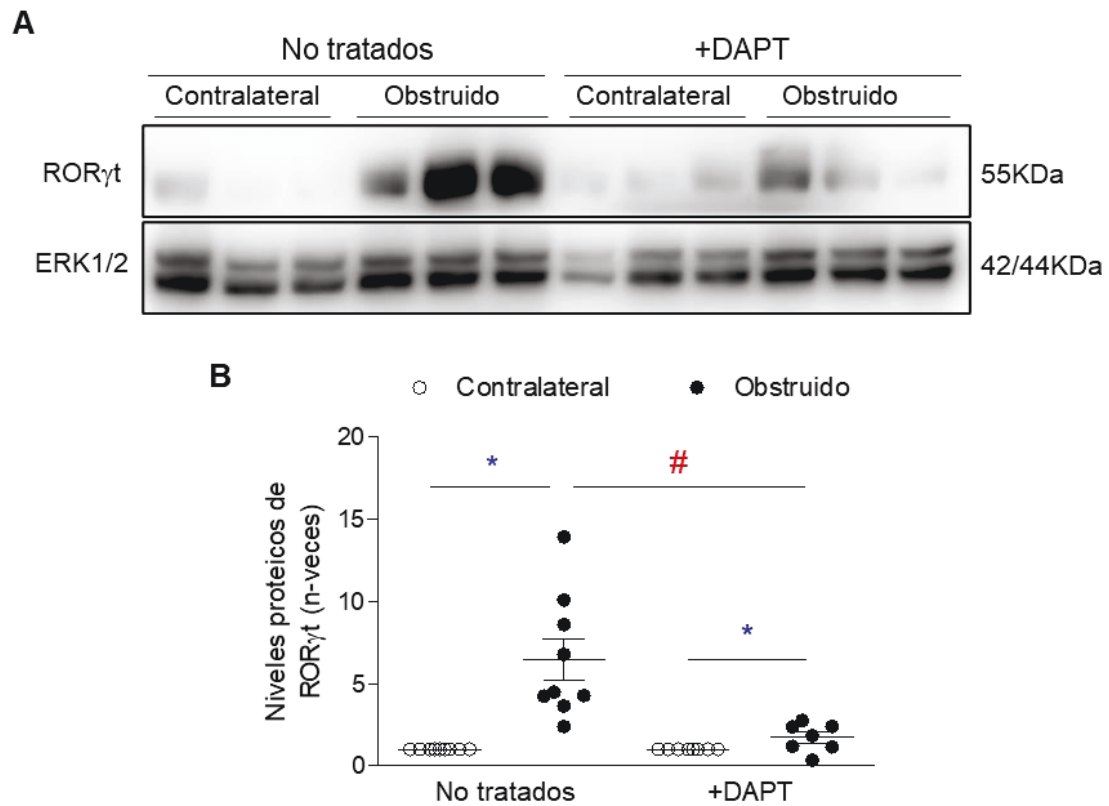


Figura 35: La inhibición de la activación de la vía de señalización de NOTCH disminuye los niveles de expresión proteica del factor de transcripción ROR γ t a los 5 días de UUO. Ratones de la cepa C57BL/6 recibieron una dosis de 100mg/ratón/día y fueron sometidos a UUO y los resultados analizados a los 5 días tras la obstrucción. (A) Western blot representativos del factor de transcripción ROR γ t y (B) su cuantificación, normalizada con respecto a los niveles de ERK1/2. n=7-9 animales por grupo. Los datos se expresan como n-veces con respecto a sus propios contralaterales y se representan como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs. contralaterales propios, # $p < 0,05$ vs obstruidos no tratados. La prueba estadística de elección fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Discusión

DISCUSIÓN

Diferentes estudios a nivel renal han evaluado los niveles de los diferentes componentes de la vía de señalización de NOTCH y su activación en diversos modelos experimentales, así como en patologías humanas^{120,122,127,177–180}. En estos últimos trabajos, los elementos más estudiados han sido los ligandos canónicos de la vía de señalización de NOTCH, sin embargo, los estudios centrados en el papel de los ligandos no canónicos de la vía de señalización de NOTCH en el daño renal son muy escasos. La presente investigación ha contribuido a dilucidar la participación del ligando no canónico DLK1 en el desarrollo y la progresión del daño renal crónico en un modelo experimental de UUU.

Activación de NOTCH1 y sobreexpresión de los ligandos no canónicos *Dlk1* y *Dlk2* en la patología renal experimental por UUU

Mientras que los componentes de la vía de señalización de NOTCH, así como la activación de la vía permanecen inhibidas o en niveles basales muy bajos en el riñón adulto sano^{120,122,179}, se ha descrito una reexpresión de algunos de estos componentes y una activación de la vía NOTCH1 en un amplio rango de enfermedades renales humanas, incluyendo la nefritis membranosa, la glomerulonefritis lúpica, la nefropatía por IgA, la nefropatía diabética, la enfermedad de cambios mínimos, la nefroesclerosis hipertensiva, la glomerulonefritis crescenta y la glomeruloesclerosis focal segmentaria^{120,177–179}. A nivel experimental, en un modelo de daño renal agudo inducido por inyección de ácido fólico, se ha demostrado la reexpresión de ARNm de diversos componentes de la vía de señalización de NOTCH1, como *Jagged-1*, el propio receptor NOTCH1 y los genes efectores *Hes* y *Hey*¹²². Estos resultados están en consonancia con lo observado en diferentes patologías renales donde la expresión proteica específica de Jagged-1 y la activación de la vía de señalización de NOTCH1, estudiada evaluando la localización de su dominio intracelular, se correlacionó con una pérdida de función renal¹²⁰. Concretamente, NOTCH1 y Jagged1 estaban expresados a nivel podocitario en las nefropatías con proteinuria y sus niveles estaban correlacionados con el nivel de proteinuria en las diferentes patologías renales. Además, en este mismo estudio, demostraron que la activación de la vía de señalización de NOTCH1 en los túbulos renales estaba asociada con un aumento de la fibrosis tubulointersticial pero no con una pérdida de la función renal¹²⁰. En otro modelo experimental de inyección intrarenal de Gremlin, la activación de la vía de señalización de NOTCH1 se observó de manera temprana a 48h, mientras que en un modelo de daño renal crónico realizado por UUU la activación de NOTCH1 se observó tras 5 días de obstrucción¹³⁰. El presente estudio confirma estos resultados de tal forma que en los riñones sometidos a UUU se encontró una activación de la vía de señalización de NOTCH1, caracterizado por localización nuclear de N1ICD, una reexpresión de Jagged-1 y aumento de la expresión génica de los efectores de la ruta *Hey-1* y *Hes-1*.

En lo que respecta a los ligandos no canónicos de la vía de NOTCH, algunos estudios han evaluado los niveles de DLK1, tanto en su localización transmembrana como los niveles de DLK1 soluble (FA-1) en diferentes condiciones patológicas humanas. Por ejemplo, el aumento y la función de FA-1 ha sido estudiado en cáncer¹⁸¹ y en obesidad¹⁸². Del mismo modo, a nivel renal, un estudio piloto realizado con 10 pacientes que sufrían alguna condición patológica relacionada con fracaso renal reflejó niveles aumentados de FA-1 en la orina y en el suero, al igual que se detectó un incremento a nivel sérico en los niveles de este factor en ratas sometidas a nefrectomía bilateral¹⁸³. En el presente trabajo, se ha demostrado que en el daño renal experimental causado por UUO, la expresión génica de los ligandos no canónicos de NOTCH, *Dlk1* y *Dlk2*, se encuentra incrementada en los riñones obstruidos frente a riñones contralaterales WT, a partir del quinto día de obstrucción y manteniéndose hasta el día 14. Además, en los animales con delección en el gen de *Dlk1*, los niveles de expresión génica de *Dlk2* en los riñones obstruidos se encontraron también aumentados e, incluso, presentaron valores mayores que los detectados en el grupo WT tras 5 días de obstrucción. En bibliografía previa se ha descrito que el ligando no canónico DLK2 presenta homología en su secuencia con DLK1 y que, por lo tanto, podría realizar funciones similares a DLK1, uniéndose al receptor e inhibiéndolo, como se descubrió en diversos estudios realizados en preadipocitos y fibroblastos embrionarios de ratón en cultivo¹⁸⁴. Todos estos datos sugieren que DLK2 podría estar mediando la inhibición del receptor de NOTCH1 en ausencia de *Dlk1*. Los resultados de este trabajo demuestran que únicamente existe un aumento significativo a nivel de expresión génica de *Dlk2* en los riñones obstruidos de los ratones deficientes en *Dlk1* con respecto a los ratones WT tras 5 días de obstrucción. Este resultado hace pensar que, durante los primeros días del daño, se produce un aumento compensatorio en la expresión de *Dlk2* en los riñones del grupo de ratones deficientes en *Dlk1*, aunque a tiempos posteriores los niveles de expresión de este factor son similares entre ambos grupos y no sería suficiente para suplir las funciones de *Dlk1*. Sin embargo, a pesar de los estudios de expresión génica, las limitaciones metodológicas no permitieron realizar estudios a nivel proteico en la expresión de DLK1 o DLK2, dejando pendiente este paso para avanzar en la investigación de los ligandos no canónicos en el daño renal. Por lo tanto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto el papel potencial que pueden tener los ligandos no canónicos de la vía de señalización de NOTCH en las enfermedades renales, abriendo una vía para la realización de futuros estudios que permitan esclarecer más profundamente el papel que desempeñan en el desarrollo y la progresión del daño renal en humanos.

Antagonismo de DLK1 en el receptor de NOTCH1 en el daño renal

En esta tesis, se ha demostrado que la delección del gen de *Dlk1* induce un aumento de la activación de la vía de señalización de NOTCH1 en ratones sometidos a UUO en comparación con los ratones WT, como se ha demostrado por diferentes técnicas. Por un lado, se ha puesto de manifiesto un aumento en la expresión de N1ICD en los riñones dañados localizada en los núcleos tanto de las células tubuloepiteliales como de las células infiltrantes, tras 14 días de obstrucción. Por otro lado, se ha determinado que este aumento no estaba presente tras 5 días

de obstrucción, lo cual, unido al aumento observado en la expresión de *Dlk2* a este tiempo, sugiere que *Dlk2* podría estar compensando la ausencia de *Dlk1* durante las primeras etapas del daño. Además, no se encontró sobreexpresión de ARNm del ligando canónico Jagged-1 a 14 días de la obstrucción en los ratones con delección en *Dlk1*, por lo que este aumento en la activación de la vía de NOTCH1 indica que es muy posiblemente debido a la delección de *Dlk1* y no a una sobreexpresión de Jagged-1.

Por otra parte, a pesar del aumento en N1ICD a los 14 días de obstrucción, el estudio de los genes efectores de la vía de señalización no mostró diferencias significativas entre los niveles de expresión tanto de *Hes-1* como de *Hey-1* entre ambos genotipos a ese tiempo concreto. Sin embargo, un dato a tener en cuenta es el aumento de *Hey-1* en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1* comparados con los WT observado tras 5 días tras la obstrucción, el cual no estaba asociado a una sobreactivación de N1ICD. Aunque para esclarecer aún más estos datos serían necesarios estudios adicionales que determinen la expresión de HES-1 y HEY-1 a nivel proteico, el aumento observado tras 5 días de obstrucción podría deberse a una respuesta rápida y transitoria de la vía de TGF- β /SMAD3, ya que se ha descrito que este eje puede activar el factor de transcripción RBPJ κ , de manera independiente a la activación de la vía de señalización de NOTCH1, y dar lugar a la expresión de *Hey-1* en un contexto de TEM¹⁸⁵. En estudios previos realizados en ratones con delección en *Dlk1* se encontraron niveles incrementados de N1ICD y de *Hey-1* en las células endoteliales tanto de aortas *ex vivo* como en los vasos de la retina *in vivo*, asociado a un aumento de la angiogénesis¹⁸⁶. Además, en células endoteliales en cultivo se determinó que existía una disminución de la transcripción del gen efector *Hes-1* relacionada directamente con la sobreexpresión de DLK1. Por otro lado, un trabajo realizado en pez cebra demostró que la formación de vasos estaba relacionada con el aumento del factor de transcripción RBP-J κ y que el tratamiento con DLK1 recombinante humano disminuía los niveles de este factor y, por tanto, reducía la angiogénesis¹⁸⁶. Todos estos datos sugieren que DLK1 actúa como un antagonista de NOTCH en diferentes situaciones patológicas.

Expresión de los diferentes receptores de NOTCH en ausencia de *Dlk1*, y su relación con el daño renal

Existen varias evidencias que sugieren que los otros receptores de la vía de NOTCH (NOTCH2, NOTCH3 y NOTCH4) también podrían participar en la progresión del daño renal, ya que se ha descrito que su activación produce cambios en vías de señalización tanto en células glomerulares y epiteliales humanas como en modelos experimentales de daño renal¹⁸⁷. En esta línea, se ha demostrado un aumento en la expresión y activación de NOTCH3 tanto en enfermedades renales humanas como en los modelos experimentales renales de isquemia/reperfusión y UUO murinos^{127,188}. En este último modelo, se ha demostrado que la deficiencia en el gen de *Notch3* reduce el daño tubular, el infiltrado inflamatorio y la acumulación de colágeno intersticial en los riñones obstruidos^{127,188,189}. De manera similar, otros estudios realizados en ratones deficientes en los genes de *Notch2* y *Notch4* mostraron una protección

frente a la nefropatía experimental inducida por ácido fólico y a la nefropatía asociada a inmunodeficiencia por HIV-1, respectivamente^{126,180}. Además, la importancia de NOTCH2 en la función del sistema inmunitario¹⁹⁰ así como en la respuesta inflamatoria en algunas patologías como el cáncer de pulmón¹⁹¹, y en el desarrollo y la progresión de la fibrosis renal¹²⁶ ha sido descrito por varios autores. En este sentido, los resultados de esta tesis muestran que en el daño renal por UUO se produce un aumento de la expresión tanto génica como proteica de los diferentes receptores de NOTCH.

Diversos estudios han sugerido que tanto *DLK1* como *DLK2* podrían estar modificando la expresión y la actividad de los cuatro receptores de NOTCH, del mismo modo que existiría una modulación directa entre ellos mediante mecanismos de retroalimentación que serían diferentes para cada caso^{83,192}. De esta manera, en adipocitos en cultivo, se ha descrito que el incremento en los niveles de NOTCH1 apenas modifica la expresión de los receptores NOTCH3 y NOTCH4, aunque sí que induce una bajada en la producción de NOTCH2. En estas mismas células, también se ha observado que la sobreexpresión de *Dlk2* no aumenta los niveles de los receptores NOTCH2 ni NOTCH4, pero sí que induce la activación de NOTCH1 y de NOTCH3⁸³. Por todo esto, y a pesar de la complejidad que parece existir en la modulación de estos receptores, los resultados del presente trabajo sugieren que la ausencia de *Dlk1* induce una disminución significativa de la expresión de NOTCH2 y una tendencia no significativa a disminuir NOTCH4 en los riñones obstruidos al compararlos con el grupo WT. De ese modo, tanto el aumento en la activación de NOTCH1, como el incremento significativo en la expresión de *Dlk2* en ausencia de *Dlk1*, podrían estar regulando negativamente la expresión de NOTCH2 sin interferir en la expresión del resto de receptores. Por otro lado, la disminución en NOTCH2 podría explicar en parte la ausencia de efecto en la acumulación de MEC observado en los riñones obstruidos de los ratones deficientes en *Dlk1*, de modo similar a los observado en los ratones deficientes en NOTCH2 en modelos de daño renal que presentan disminución en la fibrosis renal¹²⁶.

Varios trabajos postulan que el receptor de NOTCH3 podría ser el receptor de NOTCH más importante en el desarrollo de la fibrosis renal, ya que es capaz de aumentar la expresión de genes profibróticos tanto en enfermedades renales humanas como experimentales^{127,193}. Aunque en este trabajo se localizó la expresión de NOTCH3 en los túbulos y además se demostró su activación, ya que se observó tinción nuclear tubular en los riñones obstruidos de los animales con delección en *Dlk1* y los WT, no se hallaron diferencias significativas entre ambos genotipos. Este hecho podría explicar por qué no se encontraron diferencias en la acumulación de MEC entre ambos grupos. En un estudio previo donde quisieron evaluar el papel de los diferentes receptores de la vía de NOTCH en modelos de daño renal experimental, incluyendo el UUO, realizaron delecciones o sobreexpresiones específicas de estos factores en células tubulares e intersticiales¹²². De esta manera, determinaron que la activación de N1ICD en células tubulares *in vitro* inducía un aumento en la proliferación celular y en el proceso de TEM. Sin embargo, la activación de la vía de señalización de NOTCH1 *in vivo* no mostró cambios asociados a esta transición, sugiriendo que esta vía no tendría un papel directo en el proceso fibrótico¹²². Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que los ratones deficientes en *Dlk1* y sometidos a UUO

tenían una mayor inflamación, pero no más fibrosis que los WT, apoyando el principal papel proinflamatorio de la activación de NOTCH1 en el daño renal.

Papel de *Dlk1* en la regulación de las respuestas inflamatoria y fibrótica en el daño renal experimental por UO

Estudios previos realizados en ratones modificados genéticamente han demostrado que la ausencia de *Dlk1* en el desarrollo embrionario produce malformaciones esqueléticas, adipogénesis acelerada, crecimiento retardado y muerte perinatal¹⁷⁰, lo que demuestra la importancia de este ligando en el desarrollo. Sin embargo, en este trabajo la evaluación histológica en ratones adultos con delección en el gen de *Dlk1* reveló que no había ningún tipo de lesión a nivel renal. Además, los estudios realizados en esta tesis muestran que en respuesta al daño renal inducido por UO, la evolución de la dilatación y la atrofia tubular va progresando a lo largo del tiempo de obstrucción, sin presentar diferencias significativas entre los ratones deficientes en *Dlk1* y los ratones WT tras 14 días de daño. Por otro lado, la evaluación de la fibrosis renal, determinada tanto por los niveles de colágeno a través de la tinción del tricrómico de Masson, como por la presencia del marcador de miofibroblastos activados α -SMA por inmunohistoquímica, no mostró diferencias entre ambos genotipos. Contrariamente, la evaluación de la tinción de PAS determinó la existencia de un aumento exacerbado de infiltrado proinflamatorio perivascular en los riñones obstruidos de los ratones delecionados en *Dlk1* comparado con los animales WT, en los que el infiltrado inflamatorio se encontró más diseminado por el tejido. La posterior caracterización del infiltrado inflamatorio mostró la presencia de diversas células inmunitarias, incluidos macrófagos, neutrófilos, y linfocitos TCD3+ y CD4+. En todos los casos, el aumento en el número de células inmunes infiltrantes observado en los riñones dañados fue significativamente mayor en ausencia de *Dlk1*, lo que sugiere *DLK1* podría participar activamente en la regulación de la respuesta inflamatoria asociada al daño renal.

Numerosos estudios han investigado los mecanismos implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria renal, revelando que la inducción de la expresión local de mediadores proinflamatorios, y en concreto de diferentes citoquinas quimioatrayentes, son las encargadas de controlar el reclutamiento de células inmunitarias²⁶. Los estudios de expresión génica realizados en esta tesis revelaron que los niveles de ARNm de las quimioquinas CCL-2/MCP-1, CCL-5/RANTES y CXCL10, implicadas en la diapédesis de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos desde el vaso hasta el tejido^{175,194,195}, se encontraban aumentadas en los riñones obstruidos. Del mismo modo, también se determinó que la citoquina TNF- α así como las citoquinas CCL-19 y CCL-21, reguladas por la vía alternativa de NF- κ B³⁰, las cuales son capaces de activar el NF- κ B de manera independiente a la infiltración de células inmunes y así promover la expresión de quimioquinas y citoquinas en las células renales¹⁹⁶, también estaban incrementadas a nivel de ARNm en los riñones obstruidos. Aunque estos datos confirmaban estudios previos realizados también en el modelo de UO experimental^{78,130},

sorprendentemente tan solo los niveles de expresión génica de la quimioquina MCP-1 se encontraron significativamente aumentados en los riñones obstruidos de los ratones con delección en *Dlk1* en comparación con los ratones WT, efecto que fue observado tras 10 días de obstrucción y que se mantuvo posteriormente.

MCP-1 es una de las principales quimioquinas reclutadoras de monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el proceso inflamatorio renal, lo cual ha hecho que haya sido propuesta como biomarcador y diana terapéutica en varias enfermedades renales¹⁹⁷. La presencia de MCP-1 en la patología renal fue descrita por primera vez mediante una inmunotinción positiva, localizada principalmente en células tubulares renales, y sus niveles fueron correlacionados con un aumento en la infiltración de macrófagos en diferentes enfermedades renales como la nefropatía membranosa, la nefropatía por IgA y la glomeruloesclerosis¹⁹⁸. Desde entonces, la expresión renal de MCP-1 se ha asociado a la progresión de numerosas enfermedades renales, tales como la nefritis lúpica o la nefropatía diabética y sus acciones se han asociado a su unión con su receptor CCR-2^{197,199}.

Debido a la importancia de la activación del eje MCP-1/CCR-2 en la respuesta inflamatoria, se han diseñado diferentes estrategias de inhibición de estos factores a nivel experimental¹⁹⁷. Uno de los primeros estudios realizados concluyó que el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de MCP-1 disminuía el daño renal, la proteinuria y la glomeruloesclerosis a tiempos largos en un modelo de glomerulonefritis creciente en ratas *wistar*²⁰⁰. Un trabajo posterior demostró que la delección génica de *Ccl-2* en un modelo murino de nefropatía diabética inducida por la administración de estreptozotocina inducía una disminución de la respuesta inflamatoria renal provocada por el ambiente diabético, incluyendo una menor acumulación de macrófagos, así como una disminución en la proteinuria y en la creatinina en sangre. Otros estudios más recientes realizados en el modelo de nefropatía diabética en ratones deficientes en leptina (db/db), han demostrado que el bloqueo del receptor CCR-2 con diferentes antagonistas del receptor reduce la albuminuria, el daño glomerular asociado a hipertrofia y el control de la glicemia, así como disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias y mejora el metabolismo lipídico^{201–203}.

Una de las principales vías de señalización que regula la expresión de la citoquina MCP-1 es la vía clásica de NF- κ B. Esta ruta de señalización es el principal mecanismo de aumento de inflamación en el tejido renal, mediante la regulación de una gran variedad de genes proinflamatorios, incluidos quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión, a través de la fosforilación y translocación al núcleo del complejo p50/p65, donde actúa como un factor de transcripción³⁰. Como era de esperar, en el modelo de UUO estudiado en esta tesis se ha observado una activación de la vía de señalización clásica de NF- κ B en los riñones obstruidos, confirmando la relevancia de esta ruta en la activación de la respuesta inflamatoria renal. Sin embargo, los niveles de activación de la vía clásica de NF- κ B como de la expresión de sus genes diana asociados, así como la expresión de los genes diana de la vía alternativa de NF- κ B, no mostraron diferencias significativas entre los riñones obstruidos de los ratones con

deleción en *Dlk1* y los de los del grupo WT más allá del mencionado aumento en la expresión de *Ccl-2*. Los datos de esta tesis sugieren por tanto que, aunque la ausencia de *Dlk1* induce un aumento significativo y mantenido en el tiempo de MCP-1 en respuesta al daño, este parece ser independiente de la activación de la vía de NF- κ B. Entre las posibles explicaciones a estos resultados, está la activación de otras vías implicadas en el desarrollo del daño renal como son las proteínas quinasas activadas por mitógenos, como son la vía de señalización ERK, la vía de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK), la vía de p38 y la vía de ERK5, así como a través de la activación del mTORC1 que directamente aumenta la expresión de *Ccl-2*. Todas estas vías pueden inducir también la expresión de MCP-1 independientemente de la activación de la vía de NF- κ B^{204,205}. Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que la ausencia de *Dlk1* podría estar activando alguna de estas rutas e induciendo un aumento mayor en los niveles de MCP-1 en los riñones dañados por UOU que el observado en los ratones WT, de manera independiente a la activación de NF- κ B. Además, esta activación exacerbada del gen de la quimioquina MCP-1 en ausencia de *Dlk1* también podría estar jugando un papel clave en la infiltración masiva de células inmunitarias al tejido renal y en la localización perivascular de las mismas.

Respuesta inmune Th17 en el daño renal experimental por UOU en ausencia de *Dlk1*

Cuando el proceso inflamatorio inicialmente activado para sanar un tejido dañado se cronifica en el tiempo contribuye activamente a la progresión del mismo, pasando a denominarse inflamación crónica y siendo una característica común de las enfermedades renales progresivas²⁰⁶. La importancia de los linfocitos Th17, y su citoquina proinflamatoria principal, la IL-17A, está bien establecida en muchas de estas enfermedades renales incluyendo patologías inmunológicas, como la glomerulonefritis anti-mieloperoxidasa experimental, la glomerulonefritis crescente y la nefritis lúpica, así como otras enfermedades renales no inmunológicas tal y como se ha demostrado en la nefropatía diabética experimental^{154,168,207–209}. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la existencia de una asociación entre la sobreactivación de la vía de señalización de NOTCH1, el aumento de la inflamación local y la activación de la respuesta inmunitaria Th17 en los riñones obstruidos en ausencia de *Dlk1*. Además, los estudios inmunohistoquímicos reflejaron un aumento en el número de células que expresan IL-17A en los riñones dañados, encontrándose mayor presencia de estas células en los ratones deficientes en *Dlk1*. Cabe destacar que la tinción positiva de IL-17A se localizó principalmente en áreas con un elevado componente inflamatorio infiltrante, confirmando que la producción de esta citoquina se debe a células inmunitarias, sobre todo linfocitos TCD4⁺/IL-17A⁺ (Th17), linfocitos $\gamma\delta$ o neutrófilos, como se ha demostrado previamente en otros modelos experimentales de daño renal^{139,141}. Contribuyendo a sustentar estos resultados, la ausencia de *Dlk1* se asoció con un aumento de la activación local de los factores de transcripción ROR γ t y STAT3, ambos con un papel clave en la diferenciación Th17²¹⁰, en los riñones obstruidos tras 14 días de daño, lo que sugiere una polarización local de los linfocitos TCD4⁺ hacia el fenotipo Th17 en el daño renal. La

relación entre la activación de la vía de NOTCH y la expresión de ROR γ t e IL-17A ha sido previamente descrita^{211,212}, por lo que los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la ausencia de *Dlk1* en el modelo de UUO promueve la activación de la respuesta Th17 a nivel renal mediante la activación de la ruta de NOTCH1.

Como se ha comentado previamente, resulta interesante que, aunque en los riñones obstruidos hay una marcada desregulación de muchas citoquinas proinflamatorias, solo la expresión del gen de *Ccl-2*, se encontró aumentada de manera significativa tras 14 días de obstrucción en los ratones deficientes en *Dlk1* al compararlos con el grupo WT. Numerosos estudios sugieren que MCP-1 podría ser un mediador clave de las respuestas inflamatorias mediadas por la IL-17A. De este modo, estudios previos mostraron que la estimulación con IL-17A incrementa la producción de MCP-1 en células tubuloepiteliales *in vitro*¹⁵⁰ y que la administración sistémica de IL-17A en ratones induce una respuesta inflamatoria a nivel renal caracterizada principalmente por el incremento de MCP-1, pero sin modular los niveles de otras citoquinas como la IL-6 o la IL-1 β ²¹³. La modulación en la expresión de citoquinas mediada por IL-17A también parece depender de modelos experimentales estudiados, ya que en la nefropatía diabética experimental el bloqueo de la IL-17A disminuye la expresión génica de *Ccl-2*, *Ccl-5* e *Il-6*, mientras que en el modelo de daño renal inducido por administración sistémica de angiotensina II, el bloqueo de la IL-17A reduce la expresión de *Ccl-2* y *Tnfa* pero no modifica los niveles de *Il-6* ni *Il-1\beta*^{168,213}. Además, otras estrategias, como la delección del receptor de la IL-17A en un modelo experimental de nefritis lúpica demostró que la IL-17A está asociada a la expresión de quimioquinas atrayentes de macrófagos, como MCP-1 y por tanto a un incremento en el infiltrado inflamatorio²⁰⁹. Todos estos resultados apoyan la idea de que la activación local de NOTCH1 en los ratones deficientes en *Dlk1* podría contribuir a la exacerbación de la inflamación a través de un aumento en la señalización del eje IL-17A/MCP-1 (**Figura 36**).

Por otro lado, existen también numerosos estudios en diferentes órganos donde se ha descrito que la IL-17A es capaz de contribuir activamente al aumento de la fibrosis²¹⁴. En estudios experimentales de fibrosis hepática se observó aumento de IL-17A y del receptor de dicha citoquina, que provocaba mayor liberación de colágeno por las células hepáticas²¹⁵. En esta misma línea, en modelos murinos de fibrosis pulmonar y de fibrosis de piel inducidos por bleomicina, la delección de IL-17A redujo la infiltración de neutrófilos y el grado de fibrosis en ambos casos^{216,217}. Sin embargo, los estudios preclínicos realizados en patologías renales muestran resultados contradictorios²¹⁴. Por un lado, en un modelo de UUO, la fibrosis presente en los riñones obstruidos se relacionó con el reclutamiento de leucocitos inducido por la quimioquina RANTES/CCL-5 y regulado directamente por el aumento en la expresión de IL-17A²⁰⁸. De manera similar, también en un modelo experimental de UUO, se descubrió que la expresión de IL-17RA en monocitos y macrófagos era fundamental para el aumento de la acumulación de MEC en los riñones obstruidos²¹⁸, aunque no explicaron el papel que juega la IL-17A en las células no circulantes, que son en las que predomina la expresión del IL-17RA²¹⁴. Por el contrario, el bloqueo de IL-17A mediante anticuerpos neutralizantes no mejoró la fibrosis

renal ni la expresión de mediadores profibróticos en un modelo de infusión de angiotensina II en ratones²¹³, del mismo modo que la administración sistémica de IL-17A en ratón durante dos semanas no desencadenó una respuesta fibrótica ni aumentó la expresión renal de genes de MEC²¹³.

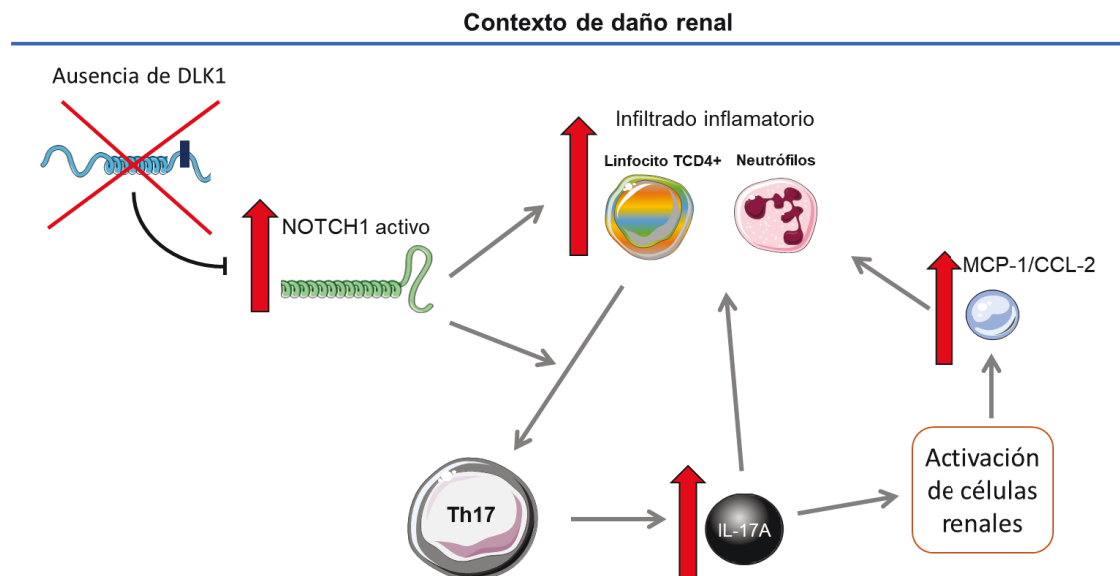


Figura 36. Contribución del aumento de inflamación en el daño renal por MCP-1/CCL-2 mediado por el eje N1ICD/Th17 en la ausencia de *Dlk1*.

Potenciales opciones terapéuticas en el daño renal: antagonistas e inhibidores de la vía de señalización de NOTCH e inhibición de la respuesta Th17

En esta tesis se ha demostrado que la inhibición de la activación de la vía de señalización de NOTCH por el inhibidor de la γ -secretasa DAPT disminuyó la respuesta inmunitaria Th17 por disminución de la IL-17A y del ROR γ t en el daño renal experimental por UUO a 5 días tras la obstrucción, demostrando de esta manera la regulación de la respuesta Th17 por NOTCH1 en el tejido renal dañado. Diversos estudios han demostrado la relevancia de la activación de la vía de señalización de NOTCH1 en la diferenciación de los timocitos hacia los diferentes subtipos de linfocitos, incluyendo los linfocitos Th17^{133,219}. Este importante papel ha sido refrendado a nivel experimental en algunas patologías inmunes como la encefalomiелitis autoinmune²¹², donde la inhibición de la activación de la vía de señalización de NOTCH mediante el uso de inhibidores farmacológicos de la γ -secretasa, disminuyeron la respuesta inmune Th17 contribuyendo a una mejor evolución de la enfermedad. A nivel renal, también existen diversos estudios preclínicos que han demostrado que el tratamiento con inhibidores de la γ -secretasa bloquea la activación de la vía de señalización de NOTCH1 y disminuyen la respuesta inflamatoria y la fibrosis tubulointersticial en la patología renal experimental^{122,130}. Sin embargo, el uso de estos

inhibidores en ensayos clínicos en diferentes patologías ha dado lugar a resultados controvertidos, como en el Alzheimer donde dos estudios tuvieron que ser paralizados debido a que los efectos tóxicos del fármaco superaban los efectos terapéuticos²²⁰ (NCT00594568). En el caso de los estudios en cáncer de pulmón evaluando los efectos de otro inhibidor de la γ -secretasa el estudio también tuvo que ser paralizado, aunque en este caso debido a que se dejó de fabricar el fármaco en cuestión (NCT01193868). A pesar de ello, aún hay ensayos clínicos en marcha evaluando el uso de inhibidores de la γ -secretasa, como en la fibromatosis agresiva asociada a tumores desmoides (NCT01981551) donde se publicaron resultados confirmando la tolerancia por los pacientes y ofreciendo resultados beneficiosos²²¹. En esta misma línea, existe un estudio en fase de reclutamiento para usar otro inhibidor de la γ -secretasa como tratamiento del mieloma múltiple resistente (NCT03502577). Aunque en base a todos estos datos todavía son necesarios estudios adicionales, todas estas patologías que han mostrado resultados alentadores con el uso de inhibidores de la γ -secretasa tienen en común el papel esencial de la respuesta inflamatoria lo sugiere que el uso de estos inhibidores podría representar una opción terapéutica de futuro para el tratamiento de las enfermedades renales crónicas.

Además de los inhibidores de la γ -secretasa, también se han realizado estudios experimentales modulando la vía de activación de NOTCH mediante el uso de abordajes como los antagonistas de algunos de los ligandos de NOTCH, entre ellos DLL-4 en el daño cardiovascular y metabólico²²², o DLK1 en el cáncer de pulmón²²³. Sin embargo, en el caso de DLK1, otros estudios han sugerido que su delección en ratones produce efectos deletéreos, como son un aumento en la angiogénesis o en el desarrollo de comportamientos similares a trastornos de ansiedad^{106,186}. En la misma línea que estos últimos estudios, los datos obtenidos en esta tesis sugieren que DLK1 está jugando un papel esencial en la progresión del daño renal experimental inducido por UUO, de tal forma que su ausencia está asociada con un incremento en la respuesta y el infiltrado inflamatorio en los riñones obstruidos en comparación con los ratones que expresan *Dlk1*. Sin embargo, un estudio reciente ha reportado que la administración de DLK1 también puede causar tumorigénesis²²⁴ lo que hace indicar que, a pesar de las esperanzas puestas en la modulación de esta vía para el tratamiento de algunas patologías, todavía son necesarios estudios adicionales.

Por otra parte, debido al papel relevante que juega la IL-17A en la respuesta inflamatoria, diferentes aproximaciones terapéuticas para inhibir su activación han sido propuestas para tratar diversas patologías humanas con un marcado componente inflamatorio. En este sentido, se han realizado diversos ensayos clínicos utilizando el anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-17A, el secukinumab, en algunas enfermedades inflamatorias como son la espondilitis anquilosante o la psoriasis dando lugar a resultados bastante prometedores^{225–228}. Como ya se ha mencionado anteriormente, en el campo de las enfermedades renales, los estudios realizados hasta ahora con anticuerpos neutralizantes de IL-17A se han llevado a cabo principalmente en modelos experimentales, dando lugar también a resultados esperanzadores. Otros ejemplos murinos de este último aspecto son un modelo de isquemia/reperfusión renal²⁰⁷, un modelo de daño renal

inducido por la administración de CCN2 y un modelo de nefropatía diabética en ratones diabéticos deficientes en leptina (db/db)¹⁶⁸. En todos ellos, la inhibición de la IL-17A ha reportado efectos beneficiosos en la progresión del daño renal, sugiriendo que el bloqueo de la respuesta Th17 puede ser una prometedora diana terapéutica en la enfermedad renal. Con esta premisa, actualmente existe un ensayo clínico activo evaluando la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad del tratamiento con secukinumab en pacientes con nefritis lúpica (NCT04181762). Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto al papel que juega la respuesta Th17 a nivel renal, han demostrado la importancia que tiene también la vía de NOTCH, concretamente del ligando no canónico DLK1, en la activación de la respuesta Th17 y en el consecuente aumento de la respuesta inflamatoria en el daño renal experimental inducido por UUO.

Conclusiones/conclusions

CONCLUSIONES

1. Los ligandos no canónicos de NOTCH, el *Dlk1* y el *Dlk2*, se reexpresan en el daño renal experimental inducido por UUO.
2. La ausencia de *Dlk1* provoca una exacerbación del infiltrado inflamatorio perivascular renal tras 14 días de UUO, pero no modifica la acumulación de matriz extracelular.
3. Los ratones deficientes en *Dlk1* presentan una sobreactivación de la vía de señalización de NOTCH1 en respuesta al daño renal por UUO, demostrando que DLK1 actúa como un antagonista de NOTCH1 en situaciones de daño renal.
4. La delección de *Dlk1* en el UUO modula la expresión de algunos de los componentes de la vía de NOTCH, entre los que se encuentran *Dlk2*, NOTCH2 y *Hey-1*, pero no modifica la expresión de otros componentes, como son Jagged-1, NOTCH3, NOTCH4, y *Hes-1*.
5. La activación de la vía de señalización de NF- κ B en el modelo de UUO no se encuentra modulada por la ausencia de *Dlk1*. De entre las citoquinas reguladas por NF- κ B, tan solo CCL-2/MCP-1 se encontró significativamente aumentada en el riñón dañado en ausencia de *Dlk1*.
6. La delección de *Dlk1* está asociada a una mayor activación de la respuesta inmunológica Th17 y a la presencia de células infiltrantes productoras de IL-17A en el riñón dañado.
7. La vía de señalización de NOTCH está directamente implicada en la regulación de la respuesta inmunológica Th17 en el daño renal por UUO.

La ausencia de *Dlk1* en un modelo experimental de daño renal crónico en ratones, induce un incremento en la activación de la vía de NOTCH1 y da lugar a un aumento del infiltrado inflamatorio y a una elevación en la respuesta inmunológica Th17 a nivel renal. Estos resultados extienden el papel de DLK1 como antagonista del receptor de NOTCH1 a la patología renal experimental.

CONCLUSIONS

1. NOTCH non-canonical ligands *Dlk1* and *Dlk2* are re-expressed in UUO-induced experimental renal damage.
2. *Dlk1* absence exacerbates the perivascular inflammatory infiltrate in the kidney 14 days after UUO, but the extracellular matrix accumulation is not modified.
3. *Dlk1*-deleted mice present an overactivation of NOTCH1 signaling pathway after 14 days of obstruction, demonstrating that *Dlk1* acts as a NOTCH1 antagonist in kidney damage.
4. *Dlk1* deletion modulates the expression of some NOTCH pathway components in the UUO-induced kidney damage, such as *Dlk2*, NOTCH2 and *Hey-1*, whereas Jagged-1, NOTCH3, NOTCH4, y *Hes-1* were not modified.
5. The NF- κ B signaling pathway is not dysregulated by the absence of *Dlk1* after 14 days of obstruction. However, among the NF- κ B regulated cytokines, only CCL-2/MCP-1 was found upregulated in the obstructed kidney of *Dlk1*-deleted mice.
6. *Dlk1* deletion induces an activation of the Th17 immune response characterized by the presence of IL-17A producing cells in the damaged kidneys.
7. The NOTCH signaling pathway is modulating the Th17 immune response activation in the obstructed kidneys.

As a sum, the deletion of the non-canonical NOTCH ligand *Dlk1* produces an overactivation of the NOTCH1 signaling pathway. This process provokes an exacerbation of the inflammatory infiltrate in the obstructed kidneys and an increase in the Th17 inflammatory response. Therefore, these results extend the role of DLK1 as an antagonist of NOTCH1 receptor to the experimental kidney damage.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Hall JE, Guyton AC. *Tratado de Fisiología Médica, 12ª Edición.*; 2011.
2. Mercado MG, Smith DK, Guard EL. Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2019;100(11):687-694.
3. Acute Kidney Injury (AKI) | KDIGO. <https://kdigo.org/guidelines/acute-kidney-injury/>. Accessed February 1, 2021.
4. Moore BJ, Torio CM. Acute Renal Failure Hospitalizations, 2005–2014: Statistical Brief #231. In: Rockville (MD); 2006.
5. Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, Ortiz A, Rodrigues-Diez RR. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* February 2020. doi:10.1038/s41581-019-0248-y
6. Webster AC, Nagler E V, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet (London, England).* 2017;389(10075):1238-1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5
7. CKD Evaluation and Management | KDIGO. <https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/>. Accessed February 1, 2021.
8. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, et al. Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrología.* 2018;38(6):606-615. doi:10.1016/j.nefro.2018.04.004
9. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet (London, England).* 2010;375(9731):2073-2081. doi:10.1016/S0140-6736(10)60674-5
10. Mills KT, Xu Y, Zhang W, et al. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int.* 2015;88(5):950-957. doi:10.1038/ki.2015.230
11. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England).* 2020;395(10225):709-733. doi:10.1016/S0140-6736(20)30045-3
12. Gabinete de comunicación de la Sociedad Española de Nefrología. LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (ERC) ALCANZA YA A SIETE MILLONES DE ESPAÑOLES, PERO PODRÍA PREVENIRSE ACTUANDO CONTRA SUS FACTORES RIESGO COMO LA DIABETES, LA HIPERTESIÓN, LA OBESIDAD O EL TABAQUISMO. *Soc Española Nefrol.* 2019;6. https://www.senefro.org/contents/webstructure/comunicacion/165_NdP_14Marzo_DMR_2019.pdf.
13. Levin A, Tonelli M, Bonventre J, et al. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet (London, England).* 2017;390(10105):1888-1917. doi:10.1016/S0140-6736(17)30788-2
14. Sancho-Martínez SM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. *Clin Kidney J.* 2015;8(5):548-559.

- doi:10.1093/ckj/sfv069
15. Mulay SR, Linkermann A, Anders HJ. Necroinflammation in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):27-39. doi:10.1681/ASN.2015040405
 16. Lv W, Booz GW, Wang Y, Fan F, Roman RJ. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *Eur J Pharmacol.* 2018;820:65-76. doi:10.1016/j.ejphar.2017.12.016
 17. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(5):802-809. doi:10.1681/ASN.2010050510
 18. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(10):738-753. doi:10.1038/nri3523
 19. Bonavia A, Singbartl K. A review of the role of immune cells in acute kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2018;33(10):1629-1639. doi:10.1007/s00467-017-3774-5
 20. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(9):493-503. doi:10.1038/nrneph.2014.114
 21. Ferenbach D, Kluth DC, Hughes J. Inflammatory cells in renal injury and repair. *Semin Nephrol.* 2007;27(3):250-259. doi:10.1016/j.semnephrol.2007.02.001
 22. Vibhushan S, Bratti M, Montero-Hernández JE, et al. Mast Cell Chymase and Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1). doi:10.3390/ijms22010302
 23. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, et al. Macrophages and recently identified forms of cell death. *Int Rev Immunol.* 2014;33(1):9-22. doi:10.3109/08830185.2013.771183
 24. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):881-900. doi:10.1016/S1357-2725(02)00271-6
 25. Dong Q, Jie Y, Ma J, Li C, Xin T, Yang D. Renal tubular cell death and inflammation response are regulated by the MAPK-ERK-CREB signaling pathway under hypoxia-reoxygenation injury. *J Recept Signal Transduct Res.* 2019;39(5-6):383-391. doi:10.1080/10799893.2019.1698050
 26. Andrade-Oliveira V, Foresto-Neto O, Watanabe IKM, Zatz R, Câmara NOS. Inflammation in Renal Diseases: New and Old Players. *Front Pharmacol.* 2019;10:1192. doi:10.3389/fphar.2019.01192
 27. Rane MJ, Zhao Y, Cai L. Krüppel-like factors (KLFs) in renal physiology and disease. *EBioMedicine.* 2019;40:743-750. doi:10.1016/j.ebiom.2019.01.021
 28. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int.* 2001;59(2):415-424. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.059002415.x
 29. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651
 30. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1254-1262. doi:10.1681/ASN.2010020218
 31. Sun S-C. The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(9):545-558. doi:10.1038/nri.2017.52

32. Rangan G, Wang Y, Harris D. NF-kappaB signalling in chronic kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:3496-3522. doi:10.2741/3467
33. Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, et al. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int*. 2001;60(4):1366-1377. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00941.x
34. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol*. 1998;161(1):430-439.
35. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Blanco J, Egido J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol*. 2001;158(5):1743-1756. doi:10.1016/s0002-9440(10)64130-2
36. Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, et al. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(7):1513-1526. doi:10.1681/ASN.2008090999
37. Starkey JM, Haidacher SJ, LeJeune WS, et al. Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor-kappaB pathways in renal cortex. *Diabetes*. 2006;55(5):1252-1259. doi:10.2337/db05-1554
38. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, et al. TWEAK activates the non-canonical NFkappaB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21. *PLoS One*. 2010;5(1):e8955. doi:10.1371/journal.pone.0008955
39. Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Valdivielso JM, et al. TRAF3 Modulation: Novel Mechanism for the Anti-inflammatory Effects of the Vitamin D Receptor Agonist Paricalcitol in Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(9):2026-2042. doi:10.1681/ASN.2019111206
40. Rodrigues-Diez R. El factor de crecimiento de tejido conectivo: Modulador redox y citoquina proinflamatoria implicada en la génesis del daño vascular. 2015. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/666690?show=full>.
41. D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv*. 2002;2(1):22-35. doi:10.1124/mi.2.1.22
42. López-Franco O, Suzuki Y, Sanjuán G, et al. Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1497-1505. doi:10.1016/s0002-9440(10)64425-2
43. Tanifuji C, Suzuki Y, Geot WM, et al. Reactive oxygen species-mediated signaling pathways in angiotensin II-induced MCP-1 expression of proximal tubular cells. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(9-10):1261-1268. doi:10.1089/ars.2005.7.1261
44. Hao QF, Wang BB, Zhang W, Qiu W, Liu QL, Li XM. NF-κB Inhibitor Parthenolide Promotes Renal Tubules Albumin Uptake in Type 2 Diabetic Nephropathy. *Chinese Med Sci J = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih*. 2020;35(1):31-42. doi:10.24920/003573
45. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med*. 2015;372(12):1138-1149. doi:10.1056/NEJMra1300575

46. Djudjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2019;65:16-36. doi:10.1016/j.mam.2018.06.002
47. Alexakis C, Maxwell P, Bou-Gharios G. Organ-specific collagen expression: implications for renal disease. *Nephron Exp Nephrol.* 2006;102(3-4):e71-5. doi:10.1159/000089684
48. Sato Y, Yanagita M. Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2018;315(6):F1501-F1512. doi:10.1152/ajprenal.00195.2018
49. Fiorentino M, Grandaliano G, Gesualdo L, Castellano G. Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Contrib Nephrol.* 2018;193:45-54. doi:10.1159/000484962
50. Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2011;92(3):158-167. doi:10.1111/j.1365-2613.2011.00764.x
51. Sun YBY, Qu X, Caruana G, Li J. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation.* 2016;92(3):102-107. doi:10.1016/j.diff.2016.05.008
52. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304(3):C216-25. doi:10.1152/ajpccell.00328.2012
53. Leaf IA, Duffield JS. What can target kidney fibrosis? *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(suppl_1):i89-i97. doi:10.1093/ndt/gfw388
54. Sato Y, Yanagita M. Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflamm Regen.* 2017;37:17. doi:10.1186/s41232-017-0048-3
55. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, et al. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int.* 2013;84(1):78-89. doi:10.1038/ki.2013.84
56. Campanholle G, Ligresti G, Gharib SA, Duffield JS. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304(7):C591-603. doi:10.1152/ajpccell.00414.2012
57. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002;110(3):341-350. doi:10.1172/JCI15518
58. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(12):2282-2287. doi:10.1681/ASN.2008050513
59. Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(10):681-695. doi:10.1016/j.tem.2016.06.004
60. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(6):325-338. doi:10.1038/nrneph.2016.48
61. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-β/TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(6):233-251. doi:10.1042/CS20110086

62. Zhao B, Chen Y-G. Regulation of TGF- β Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:874065. doi:10.1155/2014/874065
63. Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell*. 1998;1(5):673-683. doi:10.1016/s1097-2765(00)80067-2
64. Brazil DP, Church RH, Surrae S, Godson C, Martin F. BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol*. 2015;25(5):249-264. doi:10.1016/j.tcb.2014.12.004
65. Rider CC, Mulloy B. Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- β Cytokine Superfamily. *Molecules*. 2017;22(5). doi:10.3390/molecules22050713
66. Walsh DW, Godson C, Brazil DP, Martin F. Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol*. 2010;20(5):244-256. doi:10.1016/j.tcb.2010.01.008
67. Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet*. 2003;34(3):303-307. doi:10.1038/ng1178
68. McMahon R, Murphy M, Clarkson M, et al. IHG-2, a mesangial cell gene induced by high glucose, is human gremlin. Regulation by extracellular glucose concentration, cyclic mechanical strain, and transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem*. 2000;275(14):9901-9904. doi:10.1074/jbc.275.14.9901
69. Mezzano S, Droguett A, Lavoiz C, Krall P, Egido J, Ruiz-Ortega M. Gremlin and renal diseases: ready to jump the fence to clinical utility? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2018;33(5):735-741. doi:10.1093/ndt/gfx194
70. Droguett A, Krall P, Burgos ME, et al. Tubular overexpression of gremlin induces renal damage susceptibility in mice. *PLoS One*. 2014;9(7):e101879. doi:10.1371/journal.pone.0101879
71. Marchant V, Droguett A, Valderrama G, et al. Tubular overexpression of Gremlin in transgenic mice aggravates renal damage in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;309(6):F559-68. doi:10.1152/ajprenal.00023.2015
72. Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, et al. Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in glomerular crescents of pauci-immune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(7):1882-1890. doi:10.1093/ndt/gfm145
73. Droguett A, Valderrama G, Burgos ME, et al. Gremlin, A Potential Urinary Biomarker of Anca-Associated Crescentic Glomerulonephritis. *Sci Rep*. 2019;9(1):6867. doi:10.1038/s41598-019-43358-5
74. Rodrigues-Diez R, Lavoiz C, Carvajal G, et al. Gremlin is a downstream profibrotic mediator of transforming growth factor-beta in cultured renal cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2012;122(1-2):62-74. doi:10.1159/000346575
75. Rodrigues-Diez R, Rodrigues-Diez RR, Lavoiz C, et al. Gremlin activates the Smad pathway linked to epithelial mesenchymal transdifferentiation in cultured tubular epithelial cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:802841. doi:10.1155/2014/802841

76. Marquez-Exposito L, Cantero-Navarro E, R Rodrigues-Diez R, et al. Molecular Regulation of Notch Signaling by Gremlin. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1227:81-94. doi:10.1007/978-3-030-36422-9_6
77. Mitola S, Ravelli C, Moroni E, et al. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood.* 2010;116(18):3677-3680. doi:10.1182/blood-2010-06-291930
78. Lavozy C, Alique M, Rodrigues-Diez R, et al. Gremlin regulates renal inflammation via the vascular endothelial growth factor receptor 2 pathway. *J Pathol.* 2015;236(4):407-420. doi:10.1002/path.4537
79. Lavozy C, Rodrigues-Diez RR, Plaza A, et al. VEGFR2 Blockade Improves Renal Damage in an Experimental Model of Type 2 Diabetic Nephropathy. *J Clin Med.* 2020;9(2). doi:10.3390/jcm9020302
80. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development.* 2011;138(17):3593-3612. doi:10.1242/dev.063610
81. Siebel C, Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol Rev.* 2017;97(4):1235-1294. doi:10.1152/physrev.00005.2017
82. D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol.* 2010;92:73-129. doi:10.1016/S0070-2153(10)92003-6
83. Nueda M-L, González-Gómez M-J, Rodríguez-Cano M-M, et al. DLK proteins modulate NOTCH signaling to influence a brown or white 3T3-L1 adipocyte fate. *Sci Rep.* 2018;8(1):16923. doi:10.1038/s41598-018-35252-3
84. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):678-689. doi:10.1038/nrm2009
85. Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009;137(2):216-233. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045
86. Cordle J, Johnson S, Tay JZY, et al. A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15(8):849-857. doi:10.1038/nsmb.1457
87. Nueda M-L, Baladrón V, García-Ramírez J-J, et al. The novel gene EGFL9/Dlk2, highly homologous to Dlk1, functions as a modulator of adipogenesis. *J Mol Biol.* 2007;367(5):1270-1280. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.020
88. Bachmann E, Krogh TN, Højrup P, Skjødtt K, Teisner B. Mouse fetal antigen 1 (mFA1), the circulating gene product of mdlk, pref-1 and SCP-1: isolation, characterization and biology. *J Reprod Fertil.* 1996;107(2):279-285. doi:10.1530/jrf.0.1070279
89. Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, et al. dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res.* 2005;303(2):343-359. doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.001
90. Nueda M-L, Baladrón V, Sánchez-Solana B, Ballesteros M-A, Laborda J. The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells. *J Mol Biol.* 2007;367(5):1281-1293. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.043

91. Sanchez-Solana B, Nueda ML, Ruvira MD, et al. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(6):1153-1164. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.03.004
92. Traustadóttir GÁ, Jensen CH, Thomassen M, et al. Evidence of non-canonical NOTCH signaling: Delta-like 1 homolog (DLK1) directly interacts with the NOTCH1 receptor in mammals. *Cell Signal*. 2016;28(4):246-254. doi:10.1016/j.cellsig.2016.01.003
93. Fleming RJ. Ligand-Induced Cis-Inhibition of Notch Signaling: The Role of an Extracellular Region of Serrate. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1227:29-49. doi:10.1007/978-3-030-36422-9_3
94. Pandey A, Jafar-Nejad H. Cell Aggregation Assays to Evaluate the Binding of the Drosophila Notch with Trans-Ligands and its Inhibition by Cis-Ligands. *J Vis Exp*. 2018;(131). doi:10.3791/56919
95. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood*. 2010;116(13):2385-2394. doi:10.1182/blood-2009-08-239228
96. McIntyre B, Asahara T, Alev C. Overview of Basic Mechanisms of Notch Signaling in Development and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1227:9-27. doi:10.1007/978-3-030-36422-9_2
97. Kim K-A, Kim J-H, Wang Y, Sul HS. Pref-1 (preadipocyte factor 1) activates the MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2007;27(6):2294-2308. doi:10.1128/MCB.02207-06
98. Ruiz-Hidalgo MJ, Gubina E, Tull L, Baladrón V, Laborda J. dlk modulates mitogen-activated protein kinase signaling to allow or prevent differentiation. *Exp Cell Res*. 2002;274(2):178-188. doi:10.1006/excr.2001.5464
99. Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Bonvini E, Goldstein J, Laborda J. Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrane-associated dlk. *Differentiation*. 1999;64(2):103-114. doi:10.1046/j.1432-0436.1999.6420103.x
100. Wang Y, Kim K-A, Kim J-H, Sul HS. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr*. 2006;136(12):2953-2956. doi:10.1093/jn/136.12.2953
101. Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Bonvini E, Gubina E, Notario V, Laborda J. The EGF-like homeotic protein dlk affects cell growth and interacts with growth-modulating molecules in the yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(2):193-204. doi:10.1006/bbrc.2002.6431
102. Ichinose M, Suzuki N, Wang T, et al. Stromal DLK1 promotes proliferation and inhibits differentiation of the intestinal epithelium during development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2021;320(4):G506-G520. doi:10.1152/ajpgi.00445.2020
103. Chen L, Qanie D, Jafari A, et al. Delta-like 1/fetal antigen-1 (Dlk1/FA1) is a novel regulator of chondrogenic cell differentiation via inhibition of the Akt kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32140-32149. doi:10.1074/jbc.M111.230110
104. Abdallah BM, Ditzel N, Mahmood A, et al. DLK1 is a novel regulator of bone mass that mediates estrogen deficiency-induced bone loss in mice. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011;26(7):1457-1471. doi:10.1002/jbmr.346

105. Rodríguez P, Higuera MA, González-Rajal A, et al. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2012;93(2):232-241. doi:10.1093/cvr/cvr296
106. García-Gutiérrez MS, Navarrete F, Laborda J, Manzanares J. Deletion of Dlk1 increases the vulnerability to developing anxiety-like behaviors and ethanol consumption in mice. *Biochem Pharmacol*. 2018;158:37-44. doi:10.1016/j.bcp.2018.09.029
107. Marquez-Exposito L, Cantero-Navarro E, Lavoiz C, et al. Could Notch signaling pathway be a potential therapeutic option in renal diseases? *Nefrologia*. 2018;38(5):466-475. doi:10.1016/j.nefro.2017.11.027
108. Xiu M-X, Liu Y-M, Kuang B-H. The oncogenic role of Jagged1/Notch signaling in cancer. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110416. doi:10.1016/j.biopha.2020.110416
109. Gridley T. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet*. 2003;12 Spec No:R9-13. doi:10.1093/hmg/ddg052
110. Shi J, Fallahi M, Luo J-L, Petrie HT. Nonoverlapping functions for Notch1 and Notch3 during murine steady-state thymic lymphopoiesis. *Blood*. 2011;118(9):2511-2519. doi:10.1182/blood-2011-04-346726
111. Kitamoto T, Takahashi K, Takimoto H, et al. Functional redundancy of the Notch gene family during mouse embryogenesis: analysis of Notch gene expression in Notch3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(4):1154-1162. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.241
112. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev*. 1994;8(6):707-719. doi:10.1101/gad.8.6.707
113. Gratton R, Tricarico PM, Moltrasio C, et al. Pleiotropic Role of Notch Signaling in Human Skin Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12). doi:10.3390/ijms21124214
114. Huang S, Yang L, Zhao L, Xu R, Wu Y. Novel In-Frame Deletion Mutation in NOTCH1 in a Chinese Sporadic Case of Adams-Oliver Syndrome. *DNA Cell Biol*. 2020;39(5):783-789. doi:10.1089/dna.2019.5200
115. Zhang W, Zhao X, Huang J, Ou X, Jia J. Alagille syndrome: an uncommon cause of intrahepatic cholestasis in adults. *Rev Esp enfermedades Dig organo Of la Soc Esp Patol Dig*. 2019;111(4):323-326. doi:10.17235/reed.2019.5679/2018
116. Warthen DM, Moore EC, Kamath BM, et al. Jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome: increasing the mutation detection rate. *Hum Mutat*. 2006;27(5):436-443. doi:10.1002/humu.20310
117. Morrissette JD, Colliton RP, Spinner NB. Defective intracellular transport and processing of JAG1 missense mutations in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001;10(4):405-413. doi:10.1093/hmg/10.4.405
118. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(4):450-457. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.010
119. Cheng H-T, Kim M, Valerius MT, et al. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development*. 2007;134(4):801-811. doi:10.1242/dev.02773

120. Murea M, Park J-K, Sharma S, et al. Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function. *Kidney Int.* 2010;78(5):514-522. doi:10.1038/ki.2010.172
121. Piscione TD, Wu MYJ, Quaggin SE. Expression of Hairy/Enhancer of Split genes, Hes1 and Hes5, during murine nephron morphogenesis. *Gene Expr Patterns.* 2004;4(6):707-711. doi:10.1016/j.modgep.2004.04.007
122. Bielez B, Sirin Y, Si H, et al. Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans. *J Clin Invest.* 2010;120(11):4040-4054. doi:10.1172/JCI43025
123. Waters AM, Wu MYJ, Onay T, et al. Ectopic notch activation in developing podocytes causes glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(6):1139-1157. doi:10.1681/ASN.2007050596
124. Lavozy C, Rodrigues-Diez R, Benito-Martin A, et al. Angiotensin II contributes to renal fibrosis independently of Notch pathway activation. *PLoS One.* 2012;7(7):e40490. doi:10.1371/journal.pone.0040490
125. Lavozy C, Droguett A, Burgos ME, et al. Translational study of the Notch pathway in hypertensive nephropathy. *Nefrologia.* 2014;34(3):369-376. doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Jan.12436
126. Huang S, Park J, Qiu C, et al. Jagged1/Notch2 controls kidney fibrosis via Tfam-mediated metabolic reprogramming. *PLoS Biol.* 2018;16(9):e2005233. doi:10.1371/journal.pbio.2005233
127. Djudjaj S, Chatziantoniou C, Raffetseder U, et al. Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury. *J Pathol.* 2012;228(3):286-299. doi:10.1002/path.4076
128. Marquez-Exposito L, Lavozy C, Rodrigues-Diez RR, et al. Gremlin Regulates Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition via VEGFR2: Potential Role in Renal Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2018;9:1195. doi:10.3389/fphar.2018.01195
129. Walsh DW, Roxburgh SA, McGettigan P, et al. Co-regulation of Gremlin and Notch signalling in diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(1):10-21. doi:10.1016/j.bbadis.2007.09.005
130. Lavozy C, Poveda J, Marquez-Exposito L, et al. Gremlin activates the Notch pathway linked to renal inflammation. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(11):1097-1115. doi:10.1042/CS20171553
131. Osipo C, Golde TE, Osborne BA, Miele LA. Off the beaten pathway: the complex cross talk between Notch and NF-kappaB. *Lab Invest.* 2008;88(1):11-17. doi:10.1038/labinvest.3700700
132. Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system. *Immunity.* 2010;32(1):14-27. doi:10.1016/j.immuni.2010.01.004
133. Tsaouli G, Barbarulo A, Vacca A, Screpanti I, Felli MP. Molecular Mechanisms of Notch Signaling in Lymphoid Cell Lineages Development: NF-kB and Beyond. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1227:145-164. doi:10.1007/978-3-030-36422-9_10
134. Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, Guidos CJ. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:343-365. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132719

135. Deftos ML, Huang E, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity*. 2000;13(1):73-84. doi:10.1016/s1074-7613(00)00009-1
136. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(3):149-163. doi:10.1038/nri.2015.18
137. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-1132. doi:10.1038/ni1254
138. Gagliani N, Huber S. Basic Aspects of T Helper Cell Differentiation. *Methods Mol Biol*. 2017;1514:19-30. doi:10.1007/978-1-4939-6548-9_2
139. Rodrigues-Diez RR, Tejera-Muñoz A, Orejudo M, et al. Interleukin-17A: Possible mediator and therapeutic target in hypertension. *Nefrologia*. March 2021. doi:10.1016/j.nefro.2020.11.009
140. Robert M, Miossec P. Effects of Interleukin 17 on the cardiovascular system. *Autoimmun Rev*. 2017;16(9):984-991. doi:10.1016/j.autrev.2017.07.009
141. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol Med*. 2016;22(3):230-241. doi:10.1016/j.molmed.2016.01.001
142. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467-476. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018
143. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019;50(4):892-906. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.021
144. Chang SH, Dong C. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine*. 2009;46(1):7-11. doi:10.1016/j.cyto.2008.12.024
145. Swaidani S, Liu C, Zhao J, Bulek K, Li X. TRAF Regulation of IL-17 Cytokine Signaling. *Front Immunol*. 2019;10:1293. doi:10.3389/fimmu.2019.01293
146. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183(6):2593-2603. doi:10.1084/jem.183.6.2593
147. Blauvelt A, Chiricozzi A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;55(3):379-390. doi:10.1007/s12016-018-8702-3
148. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008;28(4):454-467. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004
149. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):329-333. doi:10.1038/nri1807
150. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(8):1526-1534.
151. Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, et al. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF-

- alpha and IL-1beta. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(3):F779-87. doi:10.1152/ajprenal.00198.2009
152. Hünemörder S, Treder J, Ahrens S, et al. TH1 and TH17 cells promote crescent formation in experimental autoimmune glomerulonephritis. *J Pathol.* 2015;237(1):62-71. doi:10.1002/path.4559
 153. Pindjakova J, Hanley SA, Duffy MM, et al. Interleukin-1 accounts for intrarenal Th17 cell activation during ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2012;81(4):379-390. doi:10.1038/ki.2011.348
 154. Rodrigues-Díez R, Rodrigues-Díez RR, Rayego-Mateos S, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab Invest.* 2013;93(7):812-824. doi:10.1038/labinvest.2013.67
 155. Krebs CF, Schmidt T, Riedel J-H, Panzer U. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(10):647-659. doi:10.1038/nrneph.2017.112
 156. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol.* 2008;181(12):8761-8766. doi:10.4049/jimmunol.181.12.8761
 157. Nogueira E, Hamour S, Sawant D, et al. Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2010;25(7):2209-2217. doi:10.1093/ndt/gfp783
 158. Velden J, Paust H-J, Hoxha E, et al. Renal IL-17 expression in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(12):F1663-73. doi:10.1152/ajprenal.00683.2011
 159. Rodrigues-Díez R, Aroeira LS, Orejudo M, et al. IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage. *Kidney Int.* 2014;86(2):303-315. doi:10.1038/ki.2014.33
 160. Marchant V, Tejera-Muñoz A, Marquez-Expósito L, et al. IL-17A as a Potential Therapeutic Target for Patients on Peritoneal Dialysis. *Biomolecules.* 2020;10(10). doi:10.3390/biom10101361
 161. Liappas G, González-Mateo GT, Sánchez-Díaz R, et al. Immune-Regulatory Molecule CD69 Controls Peritoneal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(12):3561-3576. doi:10.1681/ASN.2015080909
 162. Lavozy C, Rayego-Mateos S, Orejudo M, et al. Could IL-17A Be a Novel Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy? *J Clin Med.* 2020;9(1). doi:10.3390/jcm9010272
 163. Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Myśliwska J. Loss of the balance between CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol.* 2013;74(6):701-707. doi:10.1016/j.humimm.2013.01.024
 164. Vasanthakumar R, Mohan V, Anand G, Deepa M, Babu S, Aravindhan V. Serum IL-9, IL-17, and TGF- β levels in subjects with diabetic kidney disease (CURES-134). *Cytokine.* 2015;72(1):109-112. doi:10.1016/j.cyto.2014.10.009
 165. Mohamed R, Jayakumar C, Chen F, et al. Low-Dose IL-17 Therapy Prevents and Reverses Diabetic Nephropathy, Metabolic Syndrome, and Associated Organ Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(3):745-765. doi:10.1681/ASN.2014111136

166. Zhang N, Tai J, Qu Z, et al. Increased CD4(+)CXCR5(+)T follicular helper cells in diabetic nephropathy. *Autoimmunity*. 2016;49(6):405-413. doi:10.1080/08916934.2016.1196677
167. Ma J, Li YJ, Chen X, Kwan T, Chadban SJ, Wu H. Interleukin 17A promotes diabetic kidney injury. *Sci Rep*. 2019;9(1):2264. doi:10.1038/s41598-019-38811-4
168. Lavozy C, Matus YS, Orejudo M, et al. Interleukin-17A blockade reduces albuminuria and kidney injury in an accelerated model of diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2019;95(6):1418-1432. doi:10.1016/j.kint.2018.12.031
169. Cortvriendt C, Speeckaert R, Moerman A, Delanghe JR, Speeckaert MM. The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology*. 2017;49(3):247-258. doi:10.1016/j.pathol.2017.01.003
170. Moon YS, Smas CM, Lee K, et al. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol*. 2002;22(15):5585-5592. doi:10.1128/mcb.22.15.5585-5592.2002
171. Puertas-Avendaño RA, González-Gómez MJ, Ruvira MD, et al. Role of the non-canonical notch ligand delta-like protein 1 in hormone-producing cells of the adult male mouse pituitary. *J Neuroendocrinol*. 2011;23(9):849-859. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02189.x
172. Waddell JN, Zhang P, Wen Y, et al. Dlk1 is necessary for proper skeletal muscle development and regeneration. *PLoS One*. 2010;5(11):e15055. doi:10.1371/journal.pone.0015055
173. Raghunandan R, Ruiz-Hidalgo M, Jia Y, et al. Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells Dev*. 2008;17(3):495-507. doi:10.1089/scd.2007.0102
174. Mortensen SB, Jensen CH, Schneider M, et al. Membrane-tethered delta-like 1 homolog (DLK1) restricts adipose tissue size by inhibiting preadipocyte proliferation. *Diabetes*. 2012;61(11):2814-2822. doi:10.2337/db12-0176
175. Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, et al. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(4):765-776. doi:10.1007/s11255-013-0520-1
176. Zoja C, Corna D, Camozzi D, et al. How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(12):2898-2908.
177. Sirin Y, Susztak K. Notch in the kidney: development and disease. *J Pathol*. 2012;226(2):394-403. doi:10.1002/path.2967
178. Bonegio R, Susztak K. Notch signaling in diabetic nephropathy. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):986-992. doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.036
179. Lasagni L, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders. *Stem Cells*. 2010;28(9):1674-1685. doi:10.1002/stem.492
180. Puri RV, Yerrathota S, Home T, et al. Notch4 activation aggravates NF-κB-mediated inflammation in HIV-1-associated nephropathy. *Dis Model Mech*. 2019;12(12). doi:10.1242/dmm.040642
181. Jensen CH, Krogh TN, Hojrup P, et al. Protein structure of fetal antigen 1 (FA1). A novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to

- the gene products of dlk and pG2. *Eur J Biochem*. 1994;225(1):83-92.
182. Chacón MR, Miranda M, Jensen CH, et al. Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(7):1122-1129. doi:10.1038/ijo.2008.40
 183. Jensen CH, Krogh TN, Stoving RK, Holmskov U, Teisner B. Fetal antigen 1 (FA1), a circulating member of the epidermal growth factor (EGF) superfamily: ELISA development, physiology and metabolism in relation to renal function. *Clin Chim Acta*. 1997;268(1-2):1-20.
 184. Sánchez-Solana B, Nueda ML, Ruvira MD, et al. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(6):1153-1164. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.03.004
 185. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Böttinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J*. 2004;23(5):1155-1165. doi:10.1038/sj.emboj.7600069
 186. Rodríguez P, Higuera MA, Gonzalez-Rajal A, et al. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2012;93(2):232-241. doi:10.1093/cvr/cvr296
 187. Sanchez-Niño MD, Ortiz A. Notch3 and kidney injury: never two without three. *J Pathol*. 2012;228(3):266-273. doi:10.1002/path.4101
 188. Kavvadas P, Keuylian Z, Prakoura N, et al. Notch3 orchestrates epithelial and inflammatory responses to promote acute kidney injury. *Kidney Int*. 2018;94(1):126-138. doi:10.1016/j.kint.2018.01.031
 189. El Machhour F, Keuylian Z, Kavvadas P, Dussaule J-C, Chatziantoniou C. Activation of Notch3 in Glomeruli Promotes the Development of Rapidly Progressive Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(7):1561-1575. doi:10.1681/ASN.2013090968
 190. Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Notch2 and immune function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2012;360:151-161. doi:10.1007/82_2012_235
 191. Danahay H, Pessotti AD, Coote J, et al. Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. *Cell Rep*. 2015;10(2):239-252. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.017
 192. Rodríguez-Cano M-M, González-Gómez M-J, Sánchez-Solana B, et al. NOTCH Receptors and DLK Proteins Enhance Brown Adipogenesis in Mesenchymal C3H10T1/2 Cells. *Cells*. 2020;9(9). doi:10.3390/cells9092032
 193. Huang M, Zhang J, Xu H, et al. The TGFβ-ERK pathway contributes to Notch3 upregulation in the renal tubular epithelial cells of patients with obstructive nephropathy. *Cell Signal*. 2018;51:139-151. doi:10.1016/j.cellsig.2018.08.002
 194. Vazirinejad R, Ahmadi Z, Kazemi Arababadi M, Hassanshahi G, Kennedy D. The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21(6):322-330. doi:10.1159/000357780
 195. Krensky AM, Ahn Y-T. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat*

- Clin Pract Nephrol.* 2007;3(3):164-170. doi:10.1038/ncpneph0418
196. Misseri R, Meldrum DR, Dagher P, Hile K, Rink RC, Meldrum KK. Unilateral ureteral obstruction induces renal tubular cell production of tumor necrosis factor- α independent of inflammatory cell infiltration. *J Urol.* 2004;172(4 Pt 2):1595-1599; discussion 1599. doi:10.1097/01.ju.0000138902.57626.70
 197. Haller H, Bertram A, Nadrowitz F, Menne J. Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2016;25(1):42-49. doi:10.1097/MNH.0000000000000186
 198. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, van Es LA, Daha MR, Bruijn JA. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. *Clin Nephrol.* 1995;44(3):148-155.
 199. Mezzano S, Aros C, Droguett A, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(10):2505-2512. doi:10.1093/ndt/gfh207
 200. Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, et al. Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1996;10(12):1418-1425.
 201. Sullivan T, Miao Z, Dairaghi DJ, et al. CCR2 antagonist CCX140-B provides renal and glycemic benefits in diabetic transgenic human CCR2 knockin mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305(9):F1288-97. doi:10.1152/ajprenal.00316.2013
 202. Kang YS, Lee MH, Song HK, et al. CCR2 antagonism improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice. *Kidney Int.* 2010;78(9):883-894. doi:10.1038/ki.2010.263
 203. Seok SJ, Lee ES, Kim GT, et al. Blockade of CCL2/CCR2 signalling ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2013;28(7):1700-1710. doi:10.1093/ndt/gfs555
 204. Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI. Noncanonical Pathway for Regulation of CCL2 Expression by an mTORC1-FOXK1 Axis Promotes Recruitment of Tumor-Associated Macrophages. *Cell Rep.* 2017;21(9):2471-2486. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.014
 205. Cuarental L, Sucunza-Sáenz D, Valiño-Rivas L, et al. MAP3K kinases and kidney injury. *Nefrologia.* 2019;39(6):568-580. doi:10.1016/j.nefro.2019.03.004
 206. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int Suppl.* 2010;(119):S22-6. doi:10.1038/ki.2010.418
 207. Xue L, Xie K, Han X, et al. Detrimental functions of IL-17A in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Surg Res.* 2011;171(1):266-274. doi:10.1016/j.jss.2009.12.031
 208. Peng X, Xiao Z, Zhang J, Li Y, Dong Y, Du J. IL-17A produced by both $\gamma\delta$ T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J Pathol.* 2015;235(1):79-89. doi:10.1002/path.4430
 209. Ramani K, Biswas PS. Interleukin 17 signaling drives Type I Interferon induced proliferative

- crescentic glomerulonephritis in lupus-prone mice. *Clin Immunol.* 2016;162:31-36. doi:10.1016/j.clim.2015.10.009
210. Kitching AR, Holdsworth SR. The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):235-238. doi:10.1681/ASN.2010050536
 211. Mukherjee S, Schaller MA, Neupane R, Kunkel SL, Lukacs NW. Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation. *J Immunol.* 2009;182(12):7381-7388. doi:10.4049/jimmunol.0804322
 212. Keerthivasan S, Suleiman R, Lawlor R, et al. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation. *J Immunol.* 2011;187(2):692-701. doi:10.4049/jimmunol.1003658
 213. Orejudo M, Rodrigues-Diez RR, Rodrigues-Diez R, et al. Interleukin 17A Participates in Renal Inflammation Associated to Experimental and Human Hypertension. *Front Pharmacol.* 2019;10:1015. doi:10.3389/fphar.2019.01015
 214. Ramani K, Biswas PS. Interleukin-17: Friend or foe in organ fibrosis. *Cytokine.* 2019;120:282-288. doi:10.1016/j.cyto.2018.11.003
 215. Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(3):765-776.e3. doi:10.1053/j.gastro.2012.05.049
 216. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med.* 2010;207(3):535-552. doi:10.1084/jem.20092121
 217. Speeckaert R, Lambert J, Grine L, Van Gele M, De Schepper S, van Geel N. The many faces of interleukin-17 in inflammatory skin diseases. *Br J Dermatol.* 2016;175(5):892-901. doi:10.1111/bjd.14703
 218. Ge S, Hertel B, Susnik N, et al. Interleukin 17 receptor A modulates monocyte subsets and macrophage generation in vivo. *PLoS One.* 2014;9(1):e85461. doi:10.1371/journal.pone.0085461
 219. Vijayaraghavan J, Osborne BA. Notch and T Cell Function - A Complex Tale. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1066:339-354. doi:10.1007/978-3-319-89512-3_17
 220. Doody RS, Raman R, Farlow M, et al. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013;369(4):341-350. doi:10.1056/NEJMoa1210951
 221. Kummar S, O'Sullivan Coyne G, Do KT, et al. Clinical Activity of the γ -Secretase Inhibitor PF-03084014 in Adults With Desmoid Tumors (Aggressive Fibromatosis). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2017;35(14):1561-1569. doi:10.1200/JCO.2016.71.1994
 222. Fukuda D, Aikawa M. Expanding role of delta-like 4 mediated notch signaling in cardiovascular and metabolic diseases. *Circ J.* 2013;77(10):2462-2468.
 223. Takagi H, Zhao S, Muto S, et al. Delta-like 1 homolog (DLK1) as a possible therapeutic target and its application to radioimmunotherapy using (125)I-labelled anti-DLK1 antibody in lung cancer models (HOT1801 and FIGHT004). *Lung Cancer.* 2021;153:134-142. doi:10.1016/j.lungcan.2021.01.014
 224. Huang C-C, Cheng S-H, Wu C-H, et al. Delta-like 1 homologue promotes tumorigenesis and

- epithelial-mesenchymal transition of ovarian high-grade serous carcinoma through activation of Notch signaling. *Oncogene*. 2019;38(17):3201-3215. doi:10.1038/s41388-018-0658-5
225. Baeten D, Baraliakos X, Braun J, et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2013;382(9906):1705-1713. doi:10.1016/S0140-6736(13)61134-4
226. Baeten D, Sieper J, Braun J, et al. Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis. *N Engl J Med*. 2015;373(26):2534-2548. doi:10.1056/NEJMoa1505066
227. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 2012;366(13):1190-1199. doi:10.1056/NEJMoa1109997
228. Mease PJ, McInnes IB, Kirkham B, et al. Secukinumab Inhibition of Interleukin-17A in Patients with Psoriatic Arthritis. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1329-1339. doi:10.1056/NEJMoa1412679

Anexo

ANEXO

- Los resultados presentados en esta tesis forman parte de la siguiente publicación:

Marquez-Exposito, Laura; Rodrigues-Diez, Raul R.; Rayego-Mateos, Sandra; Fierro-Fernandez, Marta; Rodrigues-Diez, Raquel; Orejudo, Macarena; Santos-Sanchez, Laura; Blanco, Eva Maria; Laborda, Jorge; Mezzano, Sergio; Lamas, Santiago; Lavozy, Carolina; Ruiz-Ortega, Marta. Deletion of delta-like 1 homologue accelerates renal inflammation by modulating the Th17 immune response. FASEB JOURNAL. 35, 2021. ISSN0892-6638. DOI: 10.1096/fj.201903131R. PMID: 3336861. Tipo de publicación: artículo original. Publicado en enero del 2021.

- Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

Miguel, Veronica; Tituana, Jessica; Ignacio Herrero, J.; Herrero, Laura; Serra, Dolors; Cuevas, Paula; Barbas, Coral; Rodriguez Puyol, Diego; **Marquez-Exposito, Laura**; Ruiz-Ortega, Marta; Castillo, Carolina; Sheng, Xin; Susztak, Katalin; Ruiz-Canela, Miguel; Salas-Salvado, Jordi; Martinez Gonzalez, Miguel A.; Ortega, Sagrario; Ramos, Ricardo; Lamas, Santiago. Renal tubule Cpt1a overexpression protects from kidney fibrosis by restoring mitochondrial homeostasis. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION. 131, 2021. ISSN 0021-9738 DOI: 10.1172/JCI140695. PMID: 33465052. Tipo de publicación: artículo original. Publicado en Marzo de 2021.

Marta Fierro Sernández; Verónica Miguel*; **Laura Márquez-Expósito***; Cristina Nuevo Tapioles; J. Ignacio Herrero; Eva Blanco Ruiz; Jessica Tituaña; Carolina Castillo; Pablo Cannata; María Monsalve; Marta Ruiz Ortega; Ricardo Ramos; Santiago Lamas. MiR-9-5p protects from kidney fibrosis by metabolic reprogramming. FASEB Journal. DOI: 10.1096/fj.201901599RR. PMID: 31914684. ***Segundo autor compartido**. Tipo de publicación: artículo original. Publicado en Noviembre de 2019.

Laura Marquez-Exposito; Carolina Lavozy; Raul Rodrigues Diez; Sandra Rayego Mateos; Macarena Orejudo; Elena Cantero Navarro; Alberto Ortiz; Jesus Egido; Rafael Selgas; Sergio Mezzano; Marta Ruiz Ortega. Gremlin Regulates Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition via VEGFR2: Potential Role in Renal Fibrosis. Frontiers in Pharmacology. DOI: 10.3389/fphar.2018.01195 PMID: 30386246. Tipo de publicación: artículo original. Publicado en octubre del 2018.

Carolina Lavozy Barria*; Jonay Poveda*; **Laura Márquez-Expósito***; Sandra Rayego Mateos; Alberto Ortiz; Sergio Mezzano; Marta Ruiz Ortega. Gremlin activates the Notch pathway linked to renal inflammation. Journal of Clinical Science. DOI: 10.1042/CS20171553 PMID: 29720422. ***Primer autor compartido**. Tipo de publicación: artículo original. Publicado en mayo de 2018.

Laura Marquez-Exposito; Elena Cantero Navarro; Raúl Rodrigues Diez; Macarena Orejudo; Antonio Tejera Muñoz; Lucia Tejedor; Sandra Rayego Mateos; Javier Rández; Laura Santos Sanchez; Sergio Mezzano; Carolina Lavo; Marta Ruiz Ortega. Molecular Regulation of Notch Signaling by Gremlin. Notch Signaling in Embryology and Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology 1227. 1227, Springer Nature Switzerland. Tipo de publicación: Capítulo de libro. DOI: 10.1007/978-3-030-36422-9_6. PMID: 32072500. Publicado en Enero 2020.

Rodrigues-Diez RR; Tejera-Muñoz A; Orejudo M; **Marquez-Exposito L**; Santos L; Rayego-Mateos S; Cantero-Navarro E; Tejedor-Santamaria L; Marchant V; Ortiz A; Egido J; Mezzano S; Selgas R; Navarro-González JF; Valdivielso JM; Lavo C; Ruiz-Ortega M. Interleukin-17A: Possible mediator and therapeutic target in hypertension. Nefrologia: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología. Tipo de publicación: Revisión bibliográfica. ISSN 0211-6995. DOI: 10.1016/j.nefro.2020.11.009 PMID: 33775443. Publicado en Marzo de 2021.

Raul Rodrigues Diez; Antonio Tejera Muñoz; **Laura Marquez-Exposito**; Sandra Rayego Mateos; Laura Santos Sanchez; Vanessa Marchant; Lucía Tejedor Santamaría; Adrián Ramos; Alberto Ortiz; Jesus Egido De Los Rios; Marta Ruiz Ortega. Statins: Could an old friend help in the fight against COVID-19? British Journal of Pharmacology. Tipo de publicación: Revisión bibliográfica. DOI: 10.1111/bph.15166. PMID: 32562276. Publicado en julio de 2020.

Lavo C; Rayego-Mateos S; Orejudo M; Opazo-Ríos L; Marchant V; **Marquez-Exposito L**; Tejera-Muñoz A; Navarro-González JF; Navarro-González JF; Droguett A; Ortiz A; Egido J; Mezzano S; Rodrigues-Diez RR; Ruiz-Ortega M. Could IL-17A Be a Novel Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy? Journal of Clinical Medicine. 9- 272, MDPI. Tipo de publicación: Revisión bibliográfica. DOI: 10.3390/jcm9010272. PMID: 31963845. Publicado en enero de 2020.

Laura Márquez-Expósito; Elena Cantero Navarro; Carolina Lavo Barría; Marta Fierro Fernández; Jonay Poveda; Sandra Rayego Mateos; Raul Rodrigues Díez; Joe Luis Morgado Pascual; Macarena Orejudo; Sergio Mezzano; Marta Ruiz Ortega. Could Notch signaling pathway be a potential therapeutic option in renal diseases? Nephrology. Tipo de publicación: Revisión bibliográfica. DOI: 10.1016/j.nefro.2017.11.027. PMID: 29439807. Publicado en febrero de 2018.

RESEARCH ARTICLE

Deletion of delta-like 1 homologue accelerates renal inflammation by modulating the Th17 immune response

Laura Marquez-Exposito^{1,2} | Raul R. Rodrigues-Diez^{1,2} | Sandra Rayego-Mateos^{1,3} | Marta Fierro-Fernandez⁴ | Raquel Rodrigues-Diez⁵ | Macarena Orejudo^{1,2} | Laura Santos-Sanchez^{1,2} | Eva Maria Blanco⁴ | Jorge Laborda⁶ | Sergio Mezzano⁷ | Santiago Lamas⁴ | Carolina Lavoz⁷ | Marta Ruiz-Ortega^{1,2}

¹Cellular and Molecular Biology in Renal and Vascular Pathology, IIS-Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

²Red de Investigación Renal (REDINREN), Madrid, Spain

³Vascular and Renal Translational Research Group, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida IRBLleida, Lleida, Spain

⁴Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Madrid, Spain

⁵Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

⁶Biochemistry and Molecular Biology Branch, Department of Inorganic and Organic Chemistry and Biochemistry, University of Castilla-La Mancha, Spanish National Research Council (CSIC), Albacete, Spain

⁷Division of Nephrology, School of Medicine, Universidad Austral, Valdivia, Chile

Correspondence

Marta Ruiz-Ortega, Cellular and Molecular Biology in Renal and Vascular Pathology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2, Madrid 28040, Spain.
Email: mruizo@fjd.es

Marta Fierro-Fernandez, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera n° 1, Madrid 28049, Spain.
Email: mfierro@cbm.csic.es

Funding information

MINECO | Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Grant/Award Number: PI17/00119; Ministerio de Economía y Competitividad, Grant/Award Number: SAF2015-66107-R; Comunidad Autónoma de Madrid, Grant/Award Number: B2017/BMD-3751; Fondo Nacional de Desarrollo

Abstract

Preclinical studies have demonstrated that activation of the NOTCH pathway plays a key role in the pathogenesis of kidney damage. There is currently no information on the role of the Delta-like homologue 1 (DLK1), a NOTCH inhibitor, in the regulation of renal damage. Here, we investigated the contribution of DLK1 to experimental renal damage and the underlying molecular mechanisms. Using a *Dlk1*-null mouse model in the experimental renal damage of unilateral ureteral obstruction, we found activation of NOTCH, as shown by increased nuclear translocation of the NOTCH1 intracellular domain, and upregulation of *Dlk2/hey-1* expression compared to wild-type (WT) littermates. NOTCH1 over-activation in *Dlk1*-null injured kidneys was associated with a higher inflammatory response, characterized by infiltration of inflammatory cells, mainly CD4/IL17A + lymphocytes, and activation of the Th17 immune response. Furthermore, pharmacological NOTCH blockade inhibited the transcription factors controlling Th17 differentiation and gene expression of the Th17

Abbreviations: ADAM, A disintegrin and metalloproteinase; BCA, bicinchoninic acid assay; DAPT, N-[N-(3,5-difluorophenyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester; DLK, delta-like homologue; Dll, delta-like family; DNER, delta and NOTCH-like epidermal growth factor-related receptor; EGF, epithelial growth factor; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; F3, contactin 1; FA1, fetal antigen 1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Hes, hairy and enhancer of split; Hey, hes-related proteins; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NB-3, contactin 6; NF-κB, nuclear factor-kappa B; NICD, NOTCH intracellular domain; PAS, periodic acid-schiff; Pref-1, pre-adipocyte factor 1; PVDF, polyvinylidene difluoride; RBP-Jκ, recombination signal-binding protein-J kappa; RORγt, RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptor gamma t; STAT3, transducer and activator of transcription protein 3; Th17, lymphocyte T helper 17; Tnf-α, tumor necrosis factor-alpha; UUO, unilateral ureteral obstruction.

Carolina Lavoz and Marta Ruiz-Ortega are contribution of senior authors.

Científico y Tecnológico (FONDECYT), Grant/Award Number: 1160465; PAI (Chile), Grant/Award Number: 82140017; Gobierno de España, Grant/Award Number: IJCI-2017-31399; Gobierno de España, Grant/Award Number: FJCI-2016-29050; Fondos Feder de la Unión Europea European Union H2020, Grant/Award Number: IMprove-PD n0 812699

effector cytokine IL-17A and other related-inflammatory factors, linked to a diminution of inflammation in the injured kidneys. We propose that the non-canonical NOTCH ligand DLK1 acts as a NOTCH antagonist in renal injury regulating the Th17-mediated inflammatory response.

KEYWORDS

DLK1, inflammation, NOTCH, renal damage, Th17 response

1 | INTRODUCTION

The NOTCH pathway is an evolutionarily conserved mechanism formed by a family of receptors, ligands and transcription factors. This pathway is essential in controlling spatial patterning, morphogenesis, and homeostasis in embryonic and adult tissues.¹ The NOTCH receptors and ligands are type 1 transmembrane proteins that belong to the Epidermal Growth Factor (EGF)-like family of proteins. In mammals, four NOTCH receptors (NOTCH1/2/3/4) and five canonical NOTCH ligands (Jagged1/2 and Delta-like family [Dll 1, 3, 4]) have been identified. NOTCH signaling activation is characterized by successive proteolytic cleavages triggered by the interaction between membrane-bound NOTCH receptors and ligands expressed on neighboring cells.^{2,3} The first activating cleavage is mediated by ADAMs, followed by the action of the γ -secretase complex, which release the NOTCH receptor intracellular domain (NICD) into the cytoplasm. NICD migrates into the nucleus forming a nuclear complex with RBP-J κ , a transcriptional activator of their downstream target genes, which belongs to a large family of transcription repressors and indirectly regulates the expression of several NOTCH-target genes. These are known as Hes (hairy and enhancer of split) 1, 5, and 7 and Hey (Hes-related proteins) 1 and 2 genes.^{3,4}

Interestingly, several non-canonical ligands can regulate NOTCH signaling, including DNER (Delta and NOTCH-like epidermal growth factor-related receptor), F3/Contactin1, NB-3/Contactin6, Delta-like homologue-1 (*Dlk1*, also known as pre-adipocyte factor-1, Pref-1, or human adrenal specific cDNA, pG2)⁵ and Delta-like homologue 2 (DLK2).⁶ However, the precise function of these ligands remains unclear. DLK1 is the most studied NOTCH non-canonical ligand. DLK1 is structurally similar to the Dll ligands, contains six cysteine-rich EGF-like repeats, but lacks a DSL-binding domain at the N-terminal region of the protein and, therefore, fails to transactivate NOTCH.^{7,8} DLK1 is known to regulate several processes, including cell fate decisions, differentiation, adipogenesis, hematopoiesis, and angiogenesis.^{8,9} Although DLK1 and DLK2 have been shown to act as NOTCH signaling inhibitors in vitro,^{7,10} their function in vivo is incompletely understood. DLK1 is synthesized as a

transmembrane protein and its extracellular domain can be cleaved to generate a soluble form, called fetal antigen 1 (FA1), which circulates in blood.^{11,12}

The NOTCH pathway is highly active in kidney development, participating in nephrogenesis, tubulogenesis, and glomerulogenesis. However, in the mature kidney, very little active NOTCH-1, and expression of its canonical ligands can be detected.¹³ Previous studies have demonstrated that the NOTCH pathway is activated in human and experimental renal damage, and some authors have suggested that NOTCH-1/Jagged-1 levels could be potential biomarkers of human renal damage progression.¹⁴⁻¹⁷ FA-1 is found in serum, urine, and is highly enriched in the amniotic fluid in the second trimester. In an early study in patients with renal failure, a 10-fold increase in DLK1 serum concentration was described^{11,18} but data are lacking in more recent human studies. Some research groups, including ours, have found that NOTCH activation blockade using γ -secretase inhibitors ameliorates renal disease progression^{13,15,19-21} through the inhibition of fibroblast proliferation, epithelial to mesenchymal transition (EMT), matrix accumulation^{13,15,19,22} and, as reported more recently, by the inhibition of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) pathway activity and its effects in renal inflammation.²⁰ These data suggest that NOTCH blockade could be a potential therapeutic target for renal diseases. For this reason, in the present study, we have evaluated whether DLK1 could act as an inhibitor of NOTCH signaling in the damaged kidney, using the renal damage experimental model of unilateral ureteral obstruction (UUO) in *Dlk1*-null mice.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experimental models

All animal procedures were performed according to the guidelines of animal research in the European Community and with prior approval by the Animal Ethics Committee of the Health Research Institute IIS-Fundación Jiménez Díaz.

Description of the unilateral ureteral obstruction (UUO): Surgery was done in mice under isoflurane-induced anesthesia; the left ureter was ligated with silk (5/0) at two locations and cut between ligatures to prevent urinary tract infection

(obstructed kidney), as described.²³ In a parallel experiment, mice were randomly distributed in two groups treated with the γ -secretase inhibitor DAPT (0.1 mg/day, i.p.; Calbiochem), or vehicle, starting 1 day before UUO surgery. At least 4-10 animals per group were used. At the time of sacrifice, animals were anesthetized with 5 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer AG) and 35 mg/kg ketamine (Ketolar, Pfizer) and the kidneys were perfused in situ with cold saline before removal. A piece of the kidney (1/4) was fixed, embedded in paraffin, and used for immunohistochemistry, and the rest was snap-frozen in liquid nitrogen for renal cortex RNA and protein studies.

The UUO model was conducted in 3-month-old male 129/SvJ mice (WT) and *Dlk1*-deleted mice (*Dlk1*-null) and studied after 2, 5, 10, and 14 days; and in 3-month-old C57BL/6 mice (untreated or DAPT-treated) studied at 5 days after UUO. Ligation of one ureter causes inflammation and overproduction of several profibrotic mediators contributing to renal injury.²⁴ The UUO model has been extensively employed to investigate the contribution of gene deletion of different growth factors, receptors, and mediators in renal damage.^{23,24} Previous studies have demonstrated activation of the Th17 immune response in the UUO model, most of those studies were done in mice of C57BL/6 genetic background.^{23,25,26} The evaluation of renal lesions in UUO mice at different time points showed no difference between 129/SvJ mice (WT) and C57BL/6 mice (including renal gene expression levels of Th17-related cytokines, not shown). Due to 3R animal recommendations and mice availability, C57BL/6 mice were used to study the effect of the pharmacological NOTCH activation inhibitor DAPT in renal damage following UUO.

2.2 | Protein studies

Total protein samples from frozen renal tissue were isolated in lysis buffer as described.²³ Proteins (20-100 μ g per lane, quantified using a BCA protein assay kit) were separated on 8%-12% polyacrylamide-SDS gels under reducing conditions, as described.²³ Samples were then transferred on to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore), blocked in TBS containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk for 1 hour at room temperature, and incubated in the same buffer with different primary antibodies overnight at 4°C. After washing, membranes were incubated with the appropriate HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody (Amersham Biosciences) and developed using an ECL kit (Millipore). The quality of proteins and efficacy of protein transfer were evaluated by Red Ponceau staining and used as loading control in the ROR γ T protein studies. Results were analyzed by LAS 4000 from GE Healthcare or Amersham Imager 600 from GE Healthcare. The following

primary antibodies were employed [dilution]: Jagged-1 ([1:500]; sc-6011, Santa Cruz Biotechnology), ROR γ T ([1:1000] #14-6981-82, e-bioscience), GAPDH ([1:5000]; CB1001, Millipore), NOTCH2 ([1:500]; (D76A6) #5732T, cell signaling), NOTCH4 ([1:250]; A-1 sc-393893, Sta. Cruz Biotechnology), α -tubulin ([1:5000], T5168, Sigma-Aldrich), ERK1/2 ([1:500]; C-9 sc-514302, Sta. Cruz Biotechnology).

2.3 | Histology and immunohistochemistry

Paraffin-embedded kidney sections were stained using standard histology procedures, as described elsewhere.²³ Periodic acid Schiff staining (PAS) was performed and tubular dilation, interstitial inflammatory infiltration, and fibrosis, expressed as arbitrary units as previously described.²⁷ Immunostaining was carried out in 3 μ m-thick tissue sections. Antigen retrieval was performed using the PTlink system (Dako) with sodium citrate buffer (10 mM) adjusted to pH 6-9, depending on the immunohistochemical marker. Endogenous peroxidase was blocked. Tissue sections were incubated for 1 hour at room temperature with 4% BSA and 10% of a specific serum (depending on the secondary antibody used) in PBS to eliminate non-specific protein binding sites. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Specific biotinylated secondary antibodies (Amersham Biosciences) were used, followed by streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, and 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen, then sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin. The primary antibodies used were: N1ICD ([1:300]; ab8925, Abcam), F4/80 ([1:50]; MCA497, Bio-Rad), IL-17A ([1:250], ab9565, Abcam), CD3 ([1:100], A0452, DAKO), myeloperoxidase ([1X], IS511, DAKO), CD4([1X], IS649, DAKO) STAT3 ([1:100] #8768S, cell signaling) and NOTCH3 ([1:300]; (D11B8) #5276S, cell signaling). Specificity was checked by omission of primary antibodies. Quantitation was made by determining in 5-10 randomly chosen fields ($\times 200$ magnification) the total number of positive cells using Image-Pro Plus software (data expressed as the positive-stained area relative to the total area) or quantifying manually the number of positive nuclei.

2.4 | Gene expression studies

RNA from renal cortex (pulverized in a metallic chamber) was isolated with TriPure reagent (Roche). cDNA was synthesized by a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) using 2 μ g of total RNA primed with random hexamer primers following the manufacturer's instructions. Next, quantitative gene expression analysis was performed by real-time PCR on an AB7500 fast real-time PCR

system (Applied Biosystems) using fluorogenic TaqMan MGB probes and primers designed by Assay-on-Demand™ gene expression products. Mouse assays IDs were: *Dlk1*: Mm00494477_m1; *Dlk2*: Mm01281511_g1, *Jag-1* (*Jagged-1*): Mm00496902_m1, *Hes-1* Mm01342805_m1; *Hey-1*: Mm00468865_m1; *Ccl-2*: Mm00441242_m1; *Ccl-5* (*Rantes*): Mm01302428_m1, *Ccl19*: Mm00839967_g1, *Ccl21*: Mm03646971_gH, *Tnf- α* : Mm00443258_m1 *Cxcl10*: Mm00445235_m1, *Notch2*: Mm00803077_m1, *Notch3*: Mm01345646_m1, *Notch4*: Mm00440525_m1. Data were normalized to *Gapdh*: Mm99999915_g1 (Vic). The mRNA copy numbers were calculated for each sample by the instrument software using Ct value (“arithmetic fit point analysis for the lightcycler”). Results were expressed in copy numbers, calculated relative to control after normalization against *Gapdh*.

2.5 | Statistical analysis

Results are expressed as the n-fold increase with respect to the control as the mean and SEM. In the studies with *Dlk1*-null mice, data were obtained comparing both kidneys (contralateral vs. obstructed) in each mouse. Only when analyzing components of the NOTCH pathway, data were shown comparing all kidneys vs. contralateral kidneys of WT mice. In C57BL/6 studies, mean results from untreated contralateral kidneys were taken as reference values (control). Differences between groups were assessed by the Mann-Whitney test. Statistical significance was concluded for values of $P < .05$. These analyses were done using SPSS version 16.0 (Chicago, IL), or GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA).

3 | RESULTS

3.1 | The non-canonical NOTCH ligands *DLK1* and *DLK2* were upregulated in injured kidneys after UUO

Previous studies have shown that elimination of *Dlk1* is not deleterious; but *Dlk1*-null mice present high prenatal mortality, growth retardation, obesity, skeletal malformations, increased angiogenesis, and abnormalities of hematopoiesis.²⁸⁻³¹ Previously, NOTCH-1/Jagged activation has been demonstrated in studies performed with several experimental models of renal damage, including UUO.¹⁵ However, no data are available about gene expression levels of *Dlk1* and *Dlk2*, which code for non-canonical NOTCH ligands. We observed that obstructed kidneys from WT mice showed increased *Dlk1* and *Dlk2* gene expression compared to their corresponding contralateral kidneys starting from 5 days after renal damage and remaining elevated thereafter (Figure 1). Activation of the canonical NOTCH-1 pathway, including Jagged-1 expression, was observed as early as 2 days after UUO (Figure S1), persisting upregulated, as previously described.^{13,15,20}

3.2 | *Dlk1* deletion increases the presence of inflammatory cells in the injured kidney after UUO

To study the involvement of the non-canonical NOTCH ligand *DLK1* in experimental renal injury, the progression of kidney damage was evaluated in *Dlk1*-null mice compared to WT animals. UUO was done in both genotypes and mice

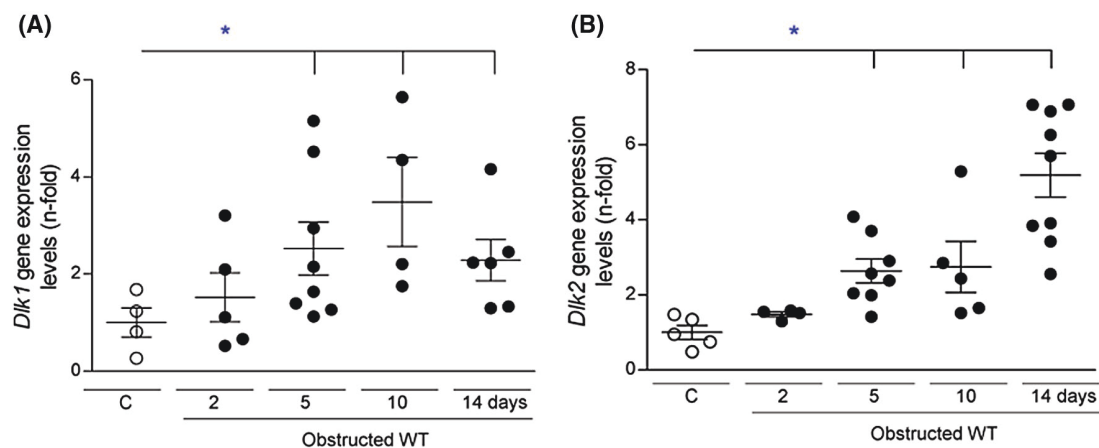


FIGURE 1 Evaluation of NOTCH non-canonical ligands *Dlk1* and *Dlk2* levels after renal injury by UUO. Unilateral ureteral obstruction (UUO) model was performed in wild-type (WT) mice from the 129/SvJ strain. Kidney mRNA expression levels of *Dlk1* (A) and *Dlk2* (B) after 2, 5, 10, and 14 days following UUO were evaluated by qRT-PCR. Gene levels in contralateral kidneys were not significantly different among time points, so only data at day 2 are shown (C = Contralateral). *Gapdh* was used as internal control. Data were normalized vs. contralateral kidneys and expressed as mean ± SEM of 4-10 animals per group. * $P < .05$ vs. Contralateral kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed

were studied after 2, 5, 10, and 14 days. Morphology of renal lesions was examined by PAS. Contralateral kidneys had no lesions (data not shown). After UUO, infiltration of immune cells in the kidney was observed, starting at 2 days and increasing thereafter (Figure 2). Nevertheless, in *Dlk1*-null mice obstructed kidneys, a marked increase in perivascular interstitial inflammatory cell infiltration compared to WT animals was observed starting after 5 days of obstruction (Figure 2D). At 14 days, a noticeably perivascular inflammatory infiltrate was found in the *Dlk1*-null mice (Figure 2B,

D). However, obstructed *Dlk1*-null kidneys did not show more tubular damage or fibrosis than obstructed WT ones at any of the studied time-points (Figure 2A, D).

3.3 | *Dlk1* deletion increases renal NOTCH1 pathway activation

The activation of the NOTCH1 pathway was determined by the evaluation of NOTCH1 intracellular domain (N1ICD)

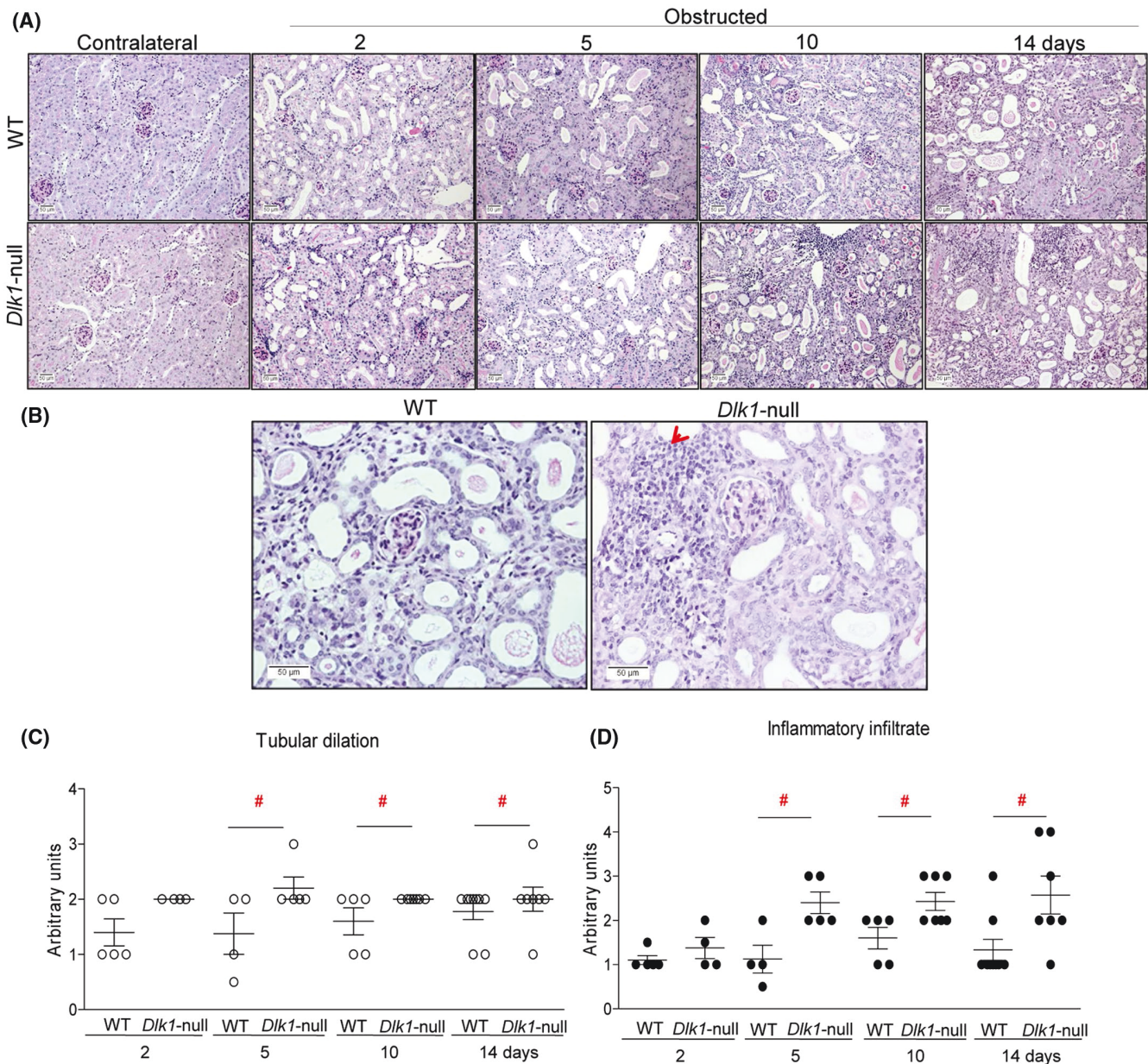


FIGURE 2 Effect of *Dlk1* deletion on experimental renal damage caused by UUO. Unilateral ureteral obstruction (UUO) was carried out in wild-type (WT) and *Dlk1*-null mice from the 129/SvJ strain and studied after 2, 5, 10, and 14 days. To evaluate renal damage, PAS staining was performed and scored. A, Representative micrographs of each group are shown at 200X. B, Obstructed kidneys of WT and *Dlk1*-null mice at 14 days at 400X. The arrow indicates the presence of inflammatory cell infiltration. Scale Bars = 50 μ m. Data of tubular dilation (C) and inflammatory infiltrate (D) are expressed as arbitrary units of 4-9 animals per group. # $P < .05$ vs. obstructed WT kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed

levels and localization. Obstructed kidneys presented increased N1ICD levels compared to contralateral ones, showing a clear nuclear localization of N1ICD (Figure 3A), as previously described in this model of renal damage.¹⁵

However, NOTCH1 activation was markedly increased in obstructed kidneys from *Dlk1*-null mice compared to WT mice, showing a significant difference between both groups at day 14, as evaluated by immunohistochemistry and western blot

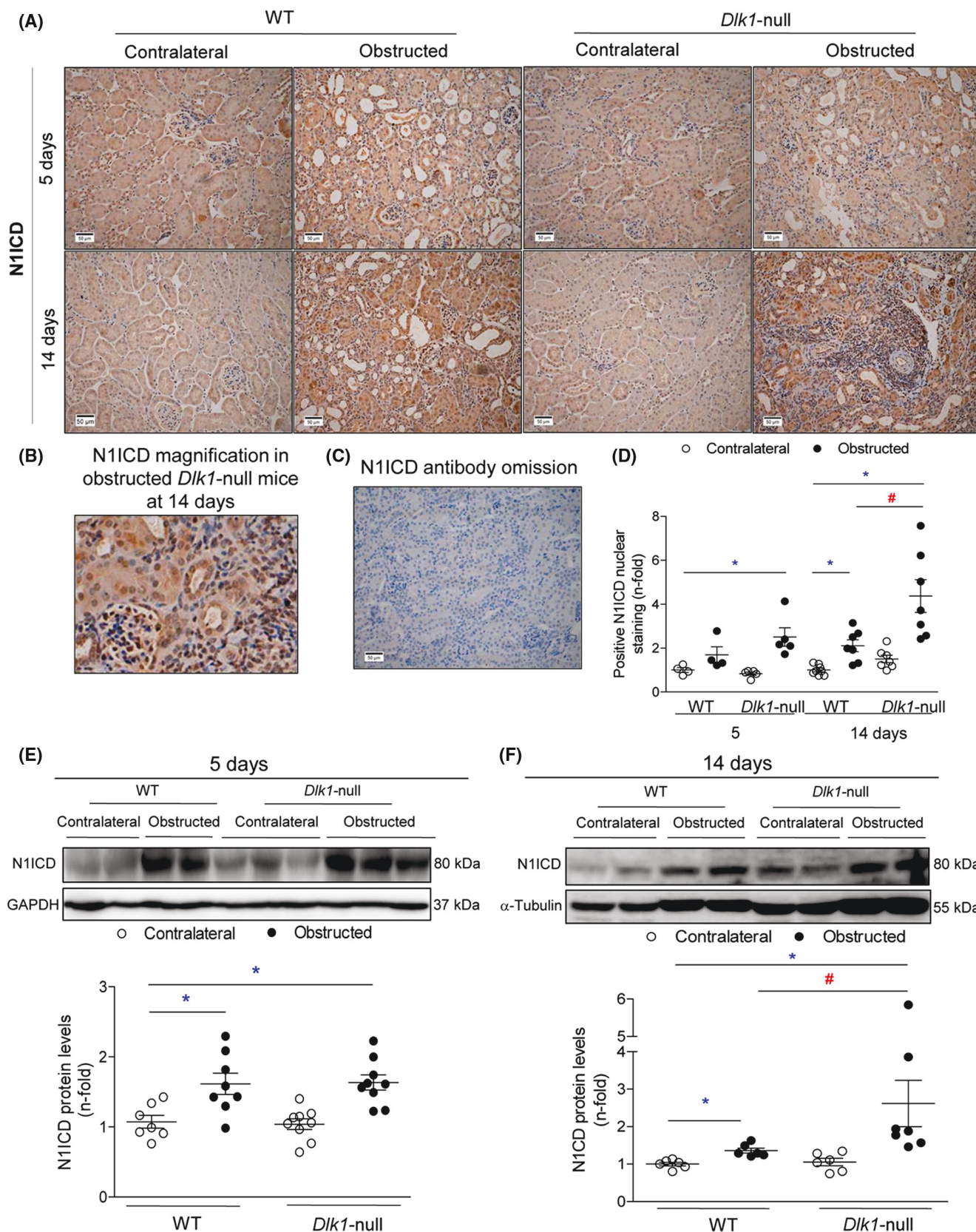


FIGURE 3 Evaluation of NOTCH activation after renal injury by UUO in wild-type and *Dlk1*-null mice. Unilateral ureteral obstruction (UUO) was carried out in wild-type (WT) and *Dlk1*-null mice from the 129/SvJ strain, and NOTCH1 activation was evaluated after 5 and 14 days of UUO. A, Microphotographs depict a representative kidney section of each group (200x magnification). Scale Bars = 50µm. B, Magnification of NOTCH1 Intracellular Domain (N1ICD) positive nuclear staining from a *Dlk1*-null obstructed kidney at 14 days. C, Negative control incubated only with secondary antibody. Scale Bars = 50µm. D, Quantitation was done by counting positive nuclear staining. Data were normalized vs. contralateral WT kidneys. E and F, Representative Western blot of N1ICD (upper panel) and the Quantitation (lower panel) at 5 (E) and 14 days (F) from total protein kidney extracts. GAPDH or α -tubulin were used as loading control and data were normalized vs. contralateral WT kidneys. Results are expressed as mean \pm SEM of f4-9 animals per group. * $P < .05$ vs. contralateral WT kidneys. # $P < .05$ vs. obstructed WT kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed.

(Figure 3). These data show that *Dlk1*-null mice present an over-activation of the NOTCH-1 pathway in the kidney.

The evaluation of the downstream N1ICD-target genes *Hes-1* and *Hey-1* showed upregulation of both genes in obstructed kidneys (Figure 4A,B), but only *Hey-1* was markedly increased in *Dlk1*-null mice compared to WT controls after 5 days of UUO (Figure 4B). Interestingly, the mRNA levels of the non-canonical NOTCH ligand *Dlk2* also showed a significant increase 5 days after obstruction in *Dlk1*-null mice compared to WT animals (Figure 4C). Jagged-1, another upstream mediator of NOTCH activation, was increased in obstructed kidneys but there was no difference between genotypes (Figure S1).

These data indicate that *Dlk1*-null mice exhibit over-activation of the NOTCH1 pathway independently of Jagged-1, reinforcing the NOTCH-antagonistic role of DLK1 in the kidney.

3.4 | Effect of *Dlk1* deletion on other NOTCH receptors

Next, we evaluated expression levels of three additional NOTCH receptors. In WT obstructed kidneys there was an upregulation of NOTCH 2, 3, and 4, both at gene and protein levels, compared to contralateral ones (Figure S2 and S3). The effect of *Dlk1* deletion was associated with reduced gene expression levels of these receptors (reaching statistical significance only for *Notch4*, Figure S2B). Some differences were also found at the protein level; NOTCH2 levels were decreased in obstructed kidneys from *Dlk1*-null mice compared to obstructed ones from WT mice (Figure S2C,D), whereas no significant differences in NOTCH3 (Figure S3) and NOTCH4 (Figure S2E,F) protein levels were detected between genotypes.

3.5 | Renal inflammation by UUO was markedly increased in the absence of *Dlk1*

Interstitial inflammatory cell infiltration is one of the earliest features of renal damage following UUO,²⁴ and contributes

to the progression of renal damage. We analyzed the infiltration of immune cells in UUO by immunohistochemistry. After 14 days, *Dlk1*-null mice obstructed kidneys showed a significantly increased number of monocytes/macrophages (F4/80 + cells), infiltrated neutrophils (myeloperoxidase staining) and T lymphocytes (CD3 + and CD4 + cells) compared to obstructed WT kidneys (Figure 5). The inflammatory cell infiltration in the kidney is regulated by the local overexpression of proinflammatory mediators. Hence, the gene expression levels of several chemokines and cytokines were evaluated. Although many of them were upregulated in the obstructed kidneys of both genotypes (Figure 6), only *Ccl-2* gene expression was significantly increased in *Dlk1*-null obstructed kidneys compared to WT mice, at 10 and 14 days (Figure 6A).

3.6 | Activation of the Th17 immune response in *Dlk1*-null mice following UUO

Dong and Griffin showed the recruitment and infiltration of the IL-17-producing CD4 + T-cell subset in murine kidneys after ureteral obstruction.²⁵ After this seminal work, numerous studies have demonstrated the importance of the Th17 immune response in renal disease, as well as the key role played by IL-17A as the effector cytokine for the regulation of renal inflammation.³² Therefore, we evaluated whether the Th17 immune response was involved in the increased presence of inflammatory cells in *Dlk1*-null obstructed kidneys. The presence of IL-17A-producing CD4 + T-cells in *Dlk1*-null obstructed kidneys was demonstrated by specific immunostaining of IL-17A (Figure 7A). The differentiation of CD4 + Th cells into Th17 cells depends on the activation of the transcription factor Signal Transducer and Activator of Transcription protein 3 (STAT3) and Retinoic acid-related Orphan Receptor γ t (ROR γ t).³³ The expression of the latter is directly activated by the binding of the complex NICD/RBPj- κ to its promoter region, as well as to the promoter region of IL-17A.^{34,35} Renal ROR γ t levels were elevated in obstructed kidneys, showing a significant increase in *Dlk1*-null compared to WT mice (Figure 7B,C).

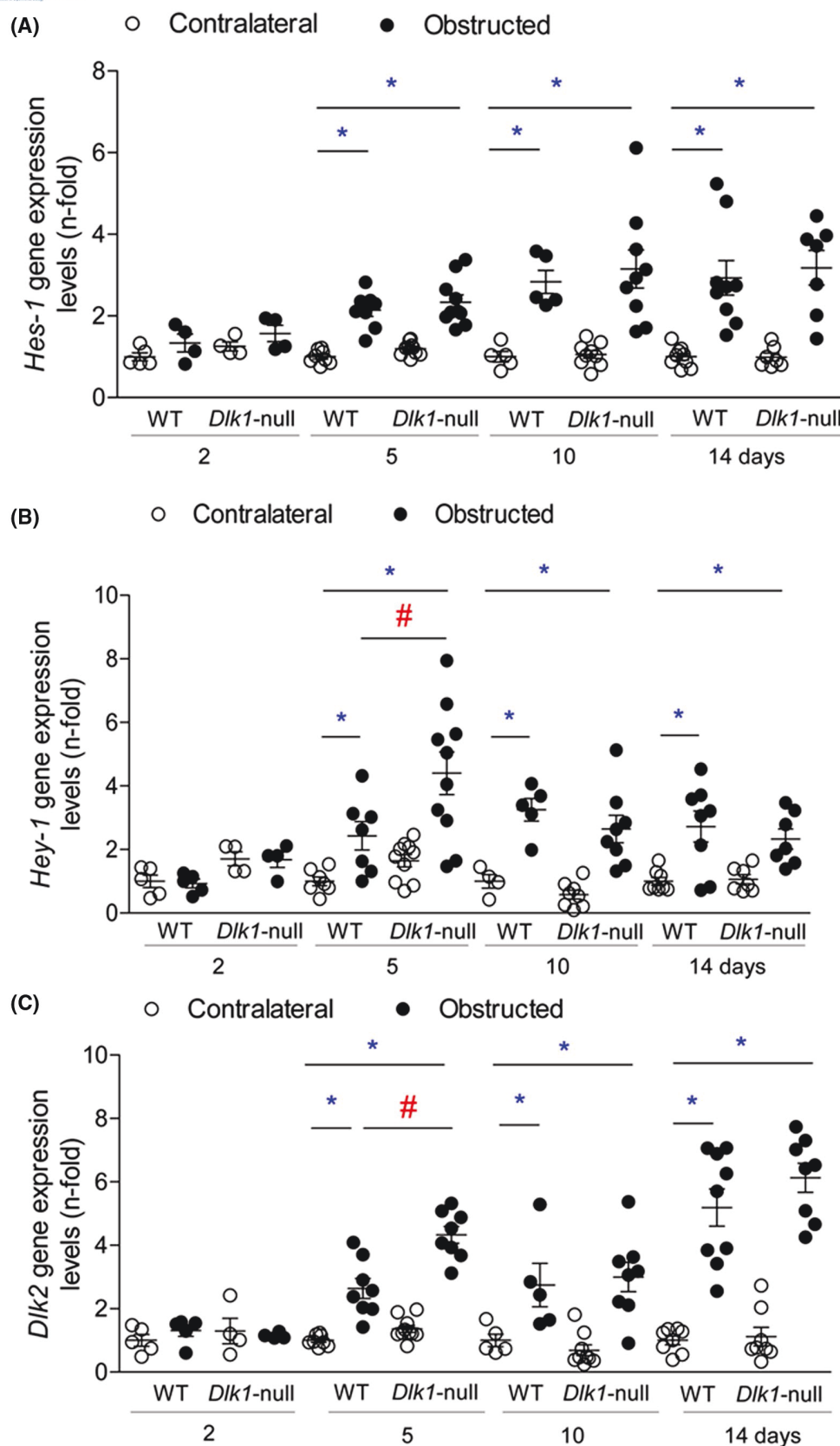


FIGURE 4 Expression of the effector NOTCH genes *Hes-1* and *Hey-1*, and the non-canonical ligand *Dlk2* after renal injury by UUO in wild-type and *Dlk1*-null mice. Unilateral ureteral obstruction (UUO) was carried out in wild-type (WT) and *Dlk1*-null mice from the 129/SvJ strain and gene expression levels of *Hes-1* (A), *Hey-1* (B) and *Dlk2* (C) were studied by qRT-PCR at 2, 5, 10, and 14 days. *Gapdh* was used as internal control. Data were normalized vs. contralateral WT kidneys and expressed as mean \pm SEM of 4-10 animals per group. * $P < .05$ vs. contralateral WT kidneys. # $P < .05$ vs. obstructed WT kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed.

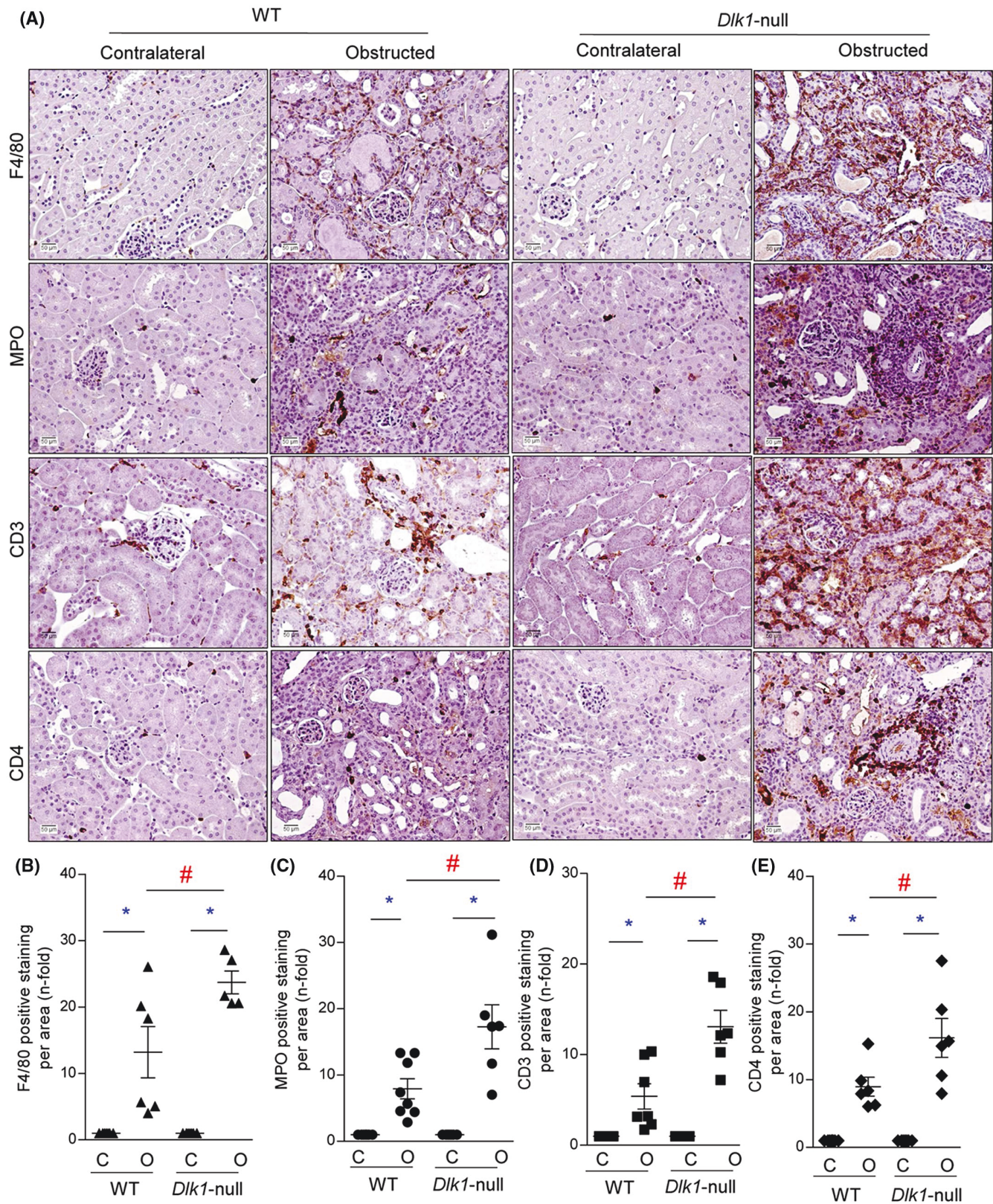


FIGURE 5 Characterization of inflammatory cell infiltration after renal injury by UUO in wild-type and *Dlk1*-null mice. Unilateral ureteral obstruction (UUO) was carried out in wild-type (WT) and *Dlk1*-null mice from the 129/SvJ strain and inflammatory cell infiltration was evaluated after 14 days. Immunohistochemistry was done using antibodies against F4/80 (marker for monocytes/macrophages/dendritic cells), myeloperoxidase (marker for neutrophils), CD3 and CD4 (markers for T lymphocytes). A, A representative kidney section micrograph from each group (magnification 200x) is shown. Scale Bars = 50µm. B-E, Quantitations are represented in the graphics for each marker (staining area per total area). C, contralateral; MPO, myeloperoxidase; O, obstructed. Data were normalized vs. their own contralateral kidneys and expressed as mean \pm SEM of 5-8 animals per group. * P < .05 vs. contralateral kidneys. # P < .05 vs. obstructed WT kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed.

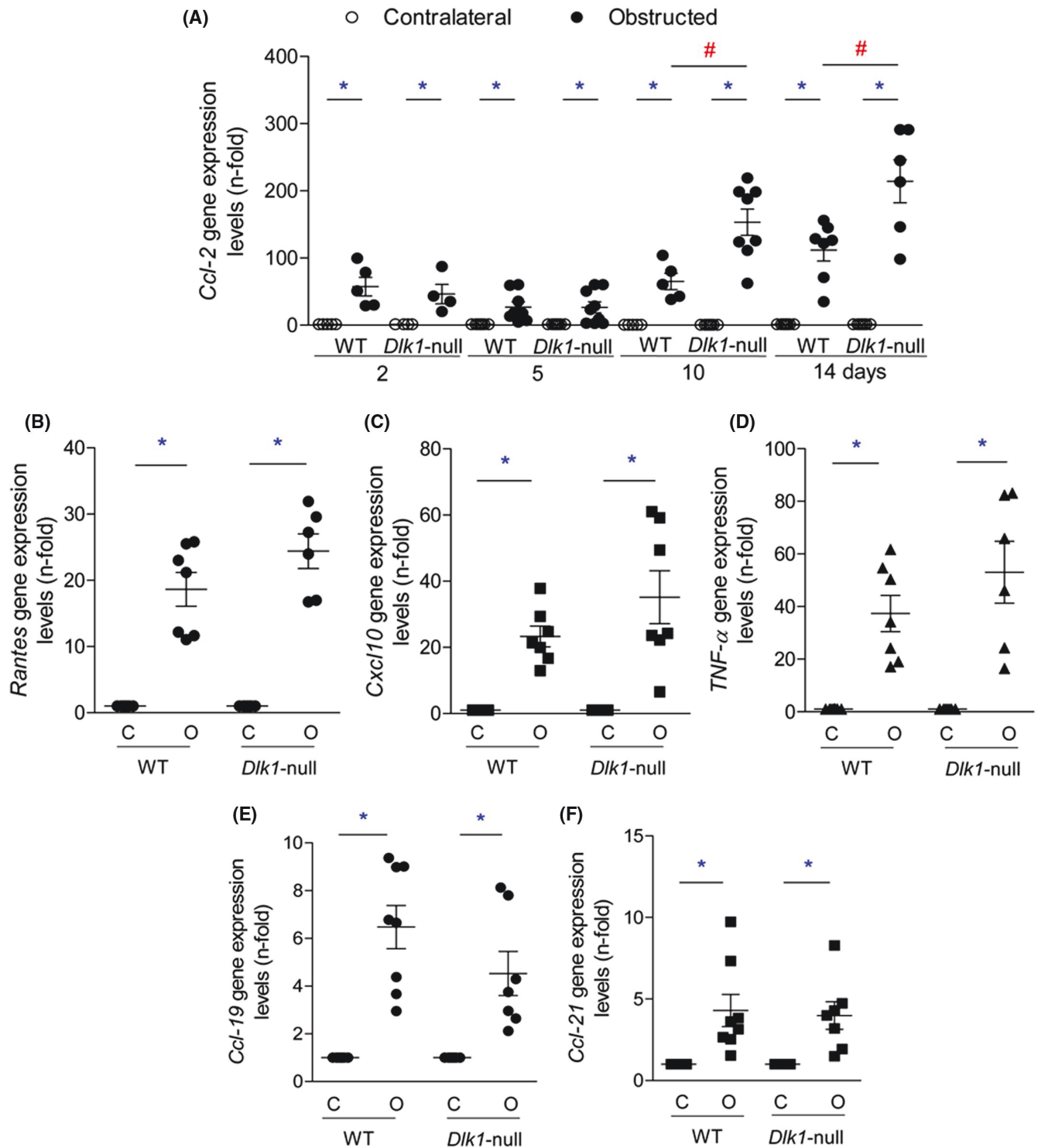


FIGURE 6 Evaluation of proinflammatory gene expression in injured kidneys by UUO. Unilateral ureteral obstruction (UUO) was carried out in wild-type (WT) and *Dlk1*-null mice from the 129/SvJ strain and sacrificed at 2, 5, 10, and 14 days. Gene expression levels of *Ccl-2* (A) at all time-points and *Rantes* (B), *Cxcl10* (C), *Tnf-α* (D), *Ccl19* (E) and *Ccl21* (F) at 14 days were determined by qRT-PCR. *Gapdh* was used as internal control. C, contralateral; O, obstructed. Data were normalized vs. their own contralateral kidneys and expressed as the mean \pm SEM of 4-9 animals per group. * $P < .05$ vs. contralateral kidneys. # $P < .05$ vs. obstructed WT kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed.

Accordingly, in *Dlk1*-null obstructed kidneys, a significant increase of phosphorylated STAT3 levels were found when compared to those of WT animals, indicating an

overactivation of nuclear STAT3 in the absence of *Dlk1* (Figure 7D,E). These data support the notion that the lack of *Dlk1* helps to over-activate the Th17 immune response.

3.7 | The γ -secretase inhibitor DAPT decreased the presence of CD4/IL-17A + cells in injured kidneys

Previous studies have shown that blockade of the NOTCH pathway improves experimental renal damage in several

murine models, including UUO, by abrogating renal inflammation, among other responses.^{15,19,20} However, the effect of the pharmacological blockade of NOTCH on the Th17 immune response observed in experimental renal damage has not been investigated. Interestingly, in autoimmune experimental diseases NOTCH inhibition modulates the Th17

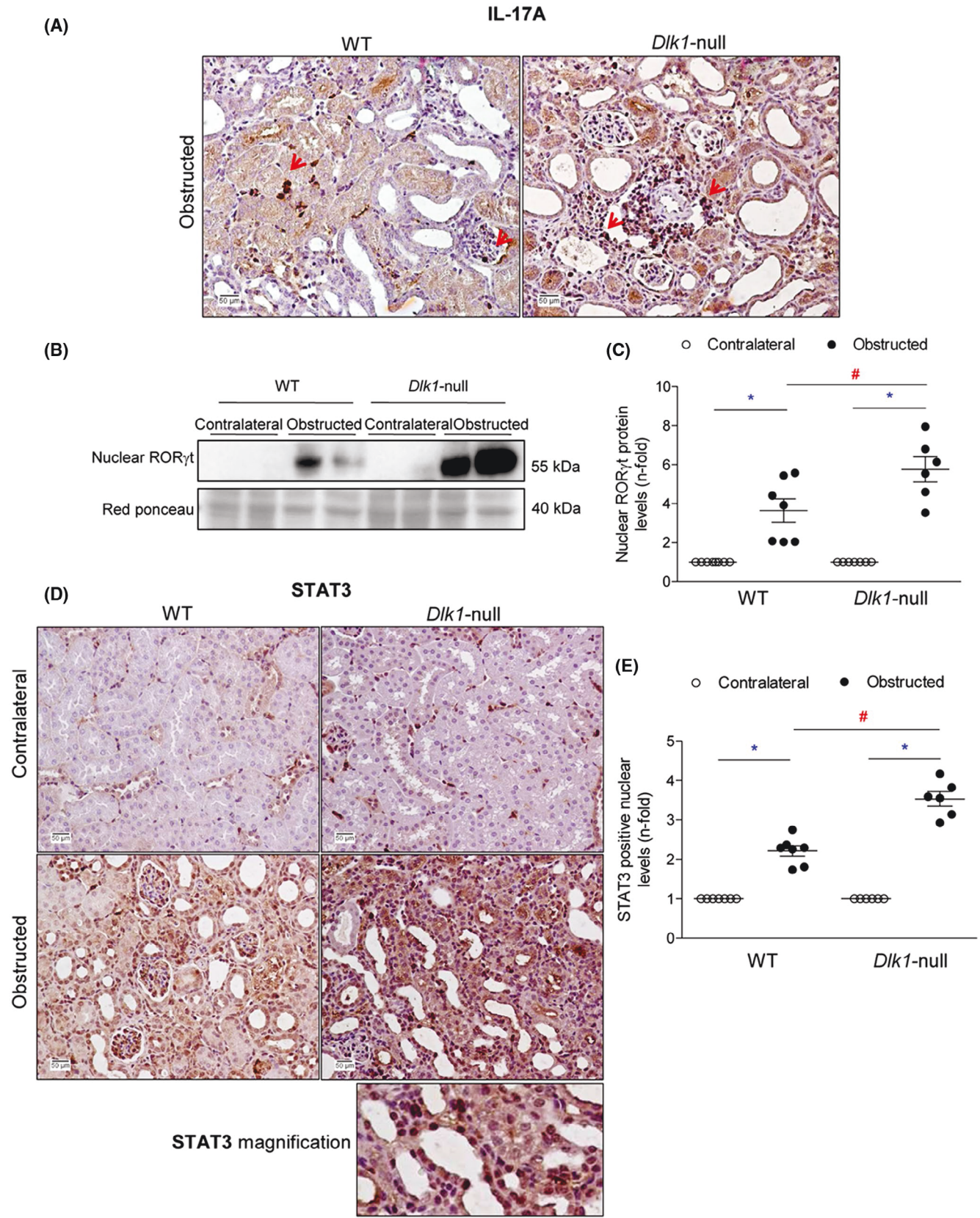


FIGURE 7 Activation of the Th17 immune response in the absence of *Dlk1* after renal injury by UVO. Unilateral ureteral obstruction (UVO) was carried out in wild-type (WT) and *Dlk1*-null mice from the 129/SvJ strain and Th17 response was evaluated after 14 days. A, IL-17A positive cells were detected by immunohistochemistry in obstructed kidneys, as indicated by arrows. B, Representative Western blot (WB) of kidney ROR γ t nuclear levels in *Dlk1*-null and WT and (C) their corresponding quantitation. Equal protein loading was confirmed by red ponceau. Data were normalized vs. their own contralateral kidneys and expressed as mean \pm SEM of 6–7 animals per group. D and E, STAT3 activation was determined by nuclear positive immunostaining. D, Representative micrographs and (E) nuclear quantitation of STAT3. Data were normalized vs. their own contralateral kidneys and expressed as mean \pm SEM of 6–7 animals per group. * P < .05 vs. contralateral kidneys, # P < .05 vs. obstructed WT kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed.

immune response.^{35–37} To inhibit NOTCH signaling, mice were pre-treated with the γ -secretase inhibitor DAPT, previously to the UVO surgery. NOTCH inhibition decreased the presence of CD4/IL-17A + cells in obstructed kidneys (Figure 8A, B) and also decreased ROR γ t protein levels (Figure 8C, D), in consistence with an inhibition of the Th17 immune response at 5 days.

4 | DISCUSSION

Several studies have evaluated the levels of the NOTCH pathway components in experimental and human renal diseases^{13–17,38,39}; however, data about non-canonical NOTCH ligands are scarce. NOTCH ligands and receptors are expressed in a wide range of renal diseases, including membranous nephritis, lupus glomerulonephritis, IgA nephropathy, and diabetic nephropathy.^{13,14,16,17} In experimental renal diseases, podocyte-specific NOTCH expression was correlated with albuminuria and glomerulosclerosis, while expression of cleaved intracellular NOTCH1 in tubules was associated with tubulointerstitial fibrosis.¹⁷ A few studies have evaluated the levels of DLK1 (or its soluble form, FA1) in human pathological conditions. Serum FA1 levels increase with obesity and they are linked to insulin-resistance.^{12,18,40} In an early study in 10 patients with renal failure, increased FA-1 serum levels were observed.¹¹ Now, we have shown that in experimental kidney damage caused by UVO the gene expression of non-canonical NOTCH ligands, *Dlk1*, and *Dlk2*, was upregulated. This attests to a relevant role for of these non-canonical ligands in renal diseases.

NOTCH activation has been observed in renal progenitors and podocytes from patients with glomerular disorders, whereas it is virtually absent from healthy adult glomeruli.¹⁶ In an elegant study by Susztak's group, the involvement of NOTCH in tubulointerstitial fibrosis was demonstrated using transgenic mice with specific NOTCH deletion or activation, both in tubular epithelial and interstitial cells, in several experimental models of renal damage, including UVO.¹⁵ In previous studies performed in cultured cells from *Dlk1*-null mice, we found increased levels of N1ICD and the downstream transcriptional effector *Hey1*, linked to angiogenesis.⁴¹ We now show that deletion of *Dlk1* induced NOTCH pathway activation in the injured kidney, as demonstrated by both higher

nuclear levels of N1ICD in *Dlk1*-null mice compared to WT mice and a consistent upregulation of the NOTCH-effector *Hey1*. Taken together these data support that the absence of *Dlk1* may contribute to de-repress the NOTCH/Hey1 pathway by reducing the presence of a functional NOTCH antagonist, therefore, suggesting that DLK1 is an antagonist of NOTCH signaling in the injured kidney. Several evidences point out that other NOTCH receptors can also participate in renal damage.⁴² NOTCH3 receptors transcripts are up-regulated in human kidney diseases and experimental mice models,³⁸ as we have confirmed here in UVO. Studies done in *Notch3*-deficient mice with the UVO model found less tubular injury and significantly reduced interstitial collagen deposition.^{38,43,44} Similarly, *Notch2*- and *Notch4*- deficient mice are protected from several renal-related injuries, such as folic-acid or immunodeficiency virus-associated nephropathy.^{39,45} In our study, total NOTCH2 and NOTCH4 receptor protein levels are decreased in *Dlk1*-null mice as compared to WT, indicating that this could be an effect of *Dlk1* deletion or of concomitant *Dlk2* overexpression. Recent findings indicate that both DLK1 and DLK2 can modulate the activity of the four NOTCH receptors,^{46,47} albeit in a different manner. This was not dissected in our study and awaits further analysis. NOTCH3 has been suggested as the most important NOTCH receptor related to kidney fibrosis.^{38,48} Although by immunohistochemistry we found NOTCH3 activation in obstructed kidneys of both WT and *Dlk1*-null mice, there were no significant differences between genotypes. Accordingly, in *Dlk1*-null mice there was exacerbated inflammation, but no further increase in fibrosis, supporting the main role of NOTCH1 activation in the renal damage observed in *Dlk1*-null mice following UVO.

Numerous data suggest that unresolved inflammation contributes to tissue damage, being chronic inflammation a common feature in progressive kidney diseases.⁴⁹ The importance of Th17 cells, and its hallmark cytokine IL-17A, in immune-mediated glomerulonephritis, including experimental antimyeloperoxidase glomerulonephritis, crescentic glomerulonephritis and lupus nephritis, as well as in non-immune renal injury is well established.^{23,50–53} Importantly, the blockade of IL-17A is a promising tool for the treatment of human chronic inflammatory diseases, as observed in ankylosing spondylitis, chronic plaque psoriasis and psoriatic arthritis.^{54–57} In renal diseases, studies in different models of

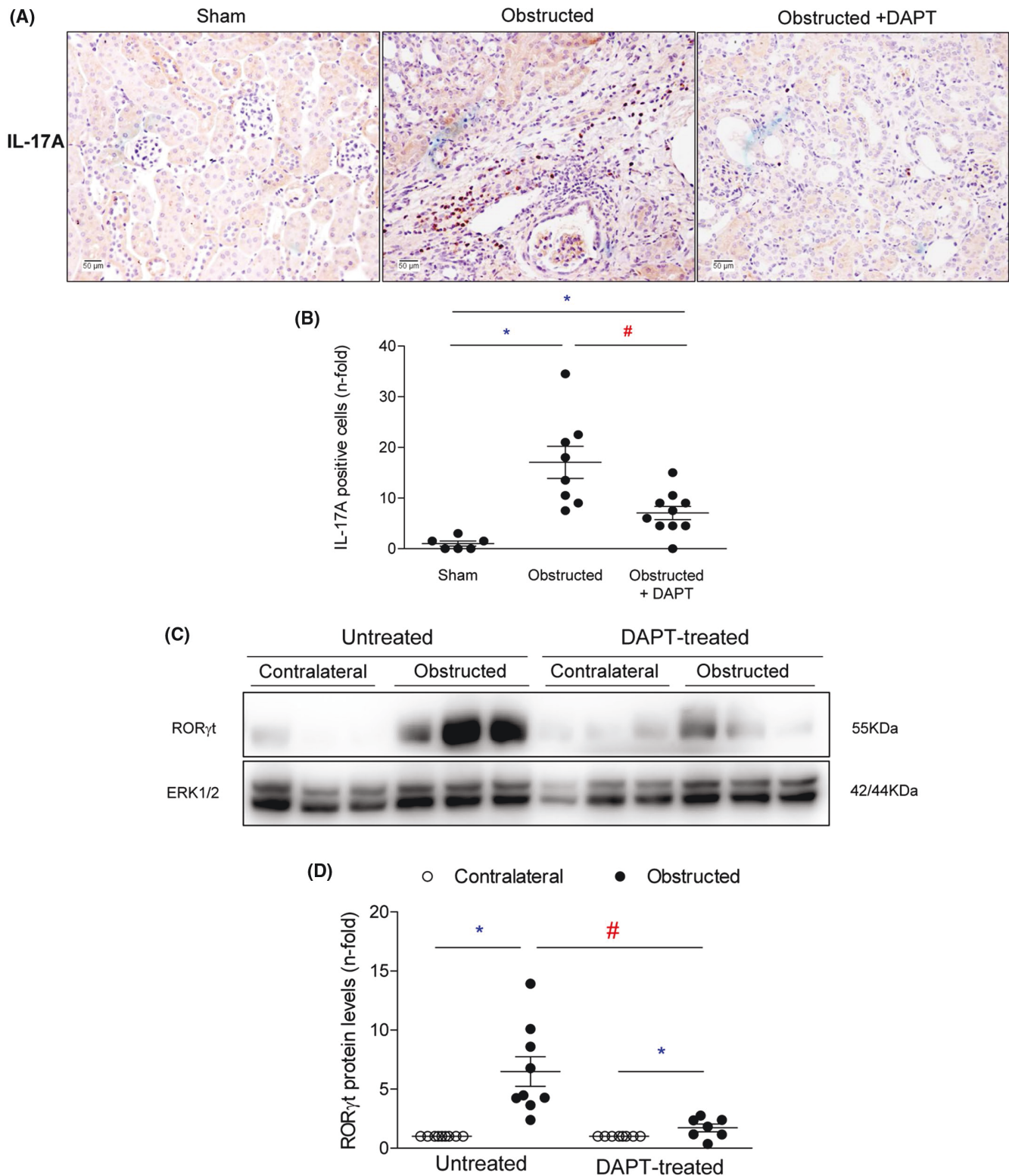


FIGURE 8 Evaluation of the effects of NOTCH1 signaling inhibition in the Th17 response in a 5-days UUO model. Unilateral ureteral obstruction (UUO) was carried out in C57BL/6 mice strain in which one group was treated with the NOTCH activation inhibitor DAPT (0.1 mg/day) and evaluated at day 5. A, Representative micrographs of IL-17A immunohistochemistry staining (Scale Bar = 50μm) and (B) the quantitation (counting positive cells). Data were normalized vs. sham kidneys and expressed as mean ± SEM of 6-10 animals per group. * $P < .05$ vs. sham kidneys, # $P < .05$ vs. obstructed kidneys. C, Representative Western blot of RORγt and (D) their quantitation. Total ERK1/2 was used as loading control. Data were normalized vs. their own contralateral kidneys and expressed as mean ± SEM of 6-10 animals per group. * $P < .05$ vs. contralateral kidneys, # $P < .05$ vs. obstructed untreated kidneys. Nonparametric two-tailed Mann-Whitney statistical test was performed

renal damage have reported beneficial effects of Th17 blockade,^{23,50–53} as proven using IL-17A neutralizing antibodies in diabetic nephropathy.⁵³ Our studies in the UUO model in *Dlk1*-deficient mice, clearly demonstrate that *Dlk1* deletion exacerbates renal inflammation associated to increased NOTCH activation. This enhanced inflammatory response was mediated by the activation of the Th17 immune response, as shown by the overexpression of the key Th17 differentiation factors, STAT-3 and ROR γ t, and the induction of IL-17A. A recent study found that NOTCH1 participates in the differentiation from CD4 + naïve T cells to different Th lymphocytes subsets, including Th17 cells, mainly via Delta-like 4 ligand-receptor interaction,⁵⁸ supporting our findings. Moreover, we have observed that treatment with the γ -secretase inhibitor DAPT, which blocks NOTCH activation, inhibited the Th17 immune response and downstream inflammatory response in obstructed kidneys. Our findings extend to renal diseases the previous studies describing that NOTCH inhibition diminished the Th17 immune response in the experimental models of allergic asthma,⁵⁹ and autoimmune encephalomyelitis.³⁵ Interestingly, although in injured kidneys there is a markedly upregulation of many proinflammatory genes, only *Ccl2* (encoding MCP-1) was significantly upregulated in *Dlk1*-null mice compared to WT mice. Several findings suggest that MCP-1 could be a key mediator of IL-17A-mediated inflammatory responses in the kidney. Earlier studies showed that IL-17A increases the production of MCP-1 in tubular epithelial cells.⁶⁰ We have recently described that systemic administration of IL-17A in mice induces renal inflammation characterized mainly by MCP-1 upregulation, whereas levels of other relevant cytokines, such as IL-6 and IL1- β , remained unchanged.⁶¹ Moreover, IL-17A blockade diminished *Ccl2* expression and inflammatory cell infiltration in the experimental models of diabetic nephropathy and Angiotensin II-induced renal damage.^{53,61} These data support that in *Dlk1*-null mice local NOTCH activation in kidneys could contribute to exacerbated inflammation by the upregulation of IL-17A/MCP-1 signaling.

Preclinical studies have shown that blockade of the NOTCH pathway by γ -secretase inhibitors¹⁵ or antagonists of some NOTCH ligands, including Delta-like 4,⁶² could be an important therapeutic option for several diseases, including chronic kidney diseases, cardiovascular pathologies, or proliferative disorders. The γ -secretase inhibitors are being tested in clinical trials as a potential treatment for several diseases, such as leukemia, melanoma, and Alzheimer's disease (NCT00594568, NCT00762411, NCT01193868, NCT01196416, NCT01981551), where the role of inflammation is of vital importance. All these studies support the idea that NOTCH inhibition, may represent a therapeutic option for the treatment of chronic kidney diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER European Union (PI17/00119 to MRO), Red de Investigación Renal REDinREN; RD16/0009 (to SL and MRO), Sociedad Española de Nefrología (to MRO), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) SAF2015-66107-R (to SL), Fundación Renal “Iñigo Alvarez de Toledo” (to SL), and Comunidad Autónoma de Madrid (B2017/BMD-3751 NOVELREN-CM) (to SL and MRO), all from Spain. The IMPROVE-PD project (“Identification and Management of Patients at Risk – Outcome and Vascular Events in Peritoneal Dialysis”) received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie Grant Agreement No 812699 (MRO). The CBMSO receives institutional support from Fundación “Ramón Areces.” The “Juan de la Cierva de Formación” training program of the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España (IJC1-2017-31399 to R.R-D and FJCI-2016-29050 supported the salary of SR-M). SM received fundation from Fondecyt 1160465 and CL from PAI 82140017, both from Chile.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All the authors have reviewed the manuscript and approved the final version. L. Marquez-Exposito contributed to the design of the experiments, acquisition, analysis, and interpretation of all data, and drafted the manuscript; R.R. Rodriguez-Diez and M. Fierro-Fernandez contributed to analysis and interpretation of data, and critical review of the manuscript; S. Rayego-Mateos, R. Rodriguez-Diez, M. Orejudo, L. Santos-Sanchez, and E. Maria Blanco participated in the development of mouse models and analysis of data; S. Mezzano has been involved in pathological characterization of the model and critical review of the manuscript; J. Laborda and S. Lamas contributed to the critical review of the manuscript and previous phenotype characterization of the *Dlk1*-null mouse model; M. Ruiz-Ortega and C. Lavoiz contributed to the design of the experiments, analysis and interpretation of the all data, draft of the manuscript and financial support of the experiments.

REFERENCES

1. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:678–689.
2. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature.* 1995;377:355–358.
3. Fortini ME. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell.* 2009;16:633–647.

4. Quillard T, Charreau B. Impact of notch signaling on inflammatory responses in cardiovascular disorders. *Int J Mol Sci*. 2013;14:6863-6888.
5. D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol*. 2010;92:73-129.
6. Nueda M-L, Baladron V, Garcia-Ramirez J-J, et al. The novel gene EGFL9/Dlk2, highly homologous to Dlk1, functions as a modulator of adipogenesis. *J Mol Biol*. 2007;367:1270-1280.
7. Sanchez-Solana B, Nueda ML, Ruvira MD, et al. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1153-1164.
8. Falix FA, Aronson DC, Lamers WH, Gaemers IC. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:988-995.
9. Laborda J. The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation. *Histol Histopathol*. 2000;15:119-129.
10. Baladron V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, et al. dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res*. 2005;303:343-359.
11. Jensen CH, Krogh TN, Stoving RK, Holmskov U, Teisner B. Fetal antigen 1 (FA1), a circulating member of the epidermal growth factor (EGF) superfamily: ELISA development, physiology and metabolism in relation to renal function. *Clin Chim Acta*. 1997;268:1-20.
12. Smas CM, Chen L, Sul HS. Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 1997;17:977-988.
13. Sirin Y, Susztak K. Notch in the kidney: development and disease. *J Pathol*. 2012;226:394-403.
14. Bonegio R, Susztak K. Notch signaling in diabetic nephropathy. *Exp Cell Res*. 2012;318:986-992.
15. Bielez B, Sirin Y, Si H, et al. Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans. *J Clin Invest*. 2010;120:4040-4054.
16. Lasagni L, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders. *Stem Cells*. 2010;28:1674-1685.
17. Murea M, Park J-K, Sharma S, et al. Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function. *Kidney Int*. 2010;78:514-522.
18. Jensen CH, Krogh TN, Hojrup P, et al. Protein structure of fetal antigen 1 (FA1). A novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to the gene products of dlk and pG2. *Eur J Biochem*. 1994;225:83-92.
19. Kretzler M, Allred L. Notch inhibition reverses kidney failure. *Nat Med*. 2008;14:246-247.
20. Lavozy C, Poveda J, Marquez-Exposito L, et al. Gremlin activates the Notch pathway linked to renal inflammation. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132:1097-1115.
21. Marquez-Exposito L, Cantero-Navarro E, Lavozy C, et al. Could Notch signaling pathway be a potential therapeutic option in renal diseases? *Nefrologia*. 2018;38:466-475.
22. Marquez-Exposito L, Lavozy C, Rodrigues-Diez RR, et al. Gremlin regulates tubular epithelial to mesenchymal transition via VEGFR2: potential role in renal fibrosis. *Front Pharmacol*. 2018;9:1195.
23. Rodrigues-Diez R, Rodrigues-Diez RR, Rayego-Mateos S, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab Invest*. 2013;93:812-824.
24. Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, et al. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol*. 2014;46:765-776.
25. Dong X, Bachman LA, Miller MN, Nath KA, Griffin MD. Dendritic cells facilitate accumulation of IL-17 T cells in the kidney following acute renal obstruction. *Kidney Int*. 2008;74:1294-1309.
26. Pindjakova J, Hanley SA, Duffy MM, et al. Interleukin-1 accounts for intrarenal Th17 cell activation during ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2012;81:379-390.
27. Zoja C, Corna D, Camozzi D, et al. How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:2898-2908.
28. Moon YS, Smas CM, Lee K, et al. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol*. 2002;22:5585-5592.
29. Raghunandan R, Ruiz-Hidalgo M, Jia Y, et al. Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells Dev*. 2008;17:495-507.
30. Waddell JN, Zhang P, Wen Y, et al. Dlk1 is necessary for proper skeletal muscle development and regeneration. *PLoS One*. 2010;5:e15055.
31. Puertas-Avendano RA, Gonzalez-Gomez MJ, Ruvira MD, et al. Role of the non-canonical notch ligand delta-like protein 1 in hormone-producing cells of the adult male mouse pituitary. *J Neuroendocrinol*. 2011;23:849-859.
32. Cortvrindt C, Speeckaert R, Moerman A, Delanghe JR, Speeckaert MM. The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology*. 2017;49:247-258.
33. Kitching AR, Holdsworth SR. The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:235-238.
34. Mukherjee S, Schaller MA, Neupane R, Kunkel SL, Lukacs NW. Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation. *J Immunol*. 2009;182:7381-7388.
35. Keerthivasan S, Suleiman R, Lawlor R, et al. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation. *J Immunol*. 2011;187:692-701.
36. Ma L, Xue H, Qi R, Wang Y, Yuan L. Effect of gamma-secretase inhibitor on Th17 cell differentiation and function of mouse psoriasis-like skin inflammation. *J Transl Med*. 2018;16:59.
37. Yin X, Liu B, Wei H, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4(+)/CD8(+), Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflamm Res*. 2019;68(9):761-774.
38. Djurdjaj S, Chatziantoniou C, Raffetseder U, et al. Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury. *J Pathol*. 2012;228:286-299.
39. Puri RV, Yerrathota S, Home T, et al. Notch4 activation aggravates NF- κ B-mediated inflammation in HIV-1-associated nephropathy. *Dis Model Mech*. 2019;12(12):dmm040642.
40. Chacon MR, Miranda M, Jensen CH, et al. Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:1122-1129.
41. Rodriguez P, Higuera MA, Gonzalez-Rajal A, et al. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2012;93:232-241.
42. Sanchez-Niño MD, Ortiz A. Notch3 and kidney injury: never two without three. *J Pathol*. 2012;228:266-273.

43. Kavvadas P, Keuylian Z, Prakoura N, et al. Notch3 orchestrates epithelial and inflammatory responses to promote acute kidney injury. *Kidney Int.* 2018;94:126-138.
44. El Machhour F, Keuylian Z, Kavvadas P, Dussaule J-C, Chatziantoniou C. Activation of Notch3 in glomeruli promotes the development of rapidly progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:1561-1575.
45. Huang S, Park J, Qiu C, et al. Jagged1/Notch2 controls kidney fibrosis via Tfam-mediated metabolic reprogramming. *PLoS Biol.* 2018;16:e2005233.
46. Nueda M-L, González-Gómez M-J, Rodríguez-Cano M-M, et al. DLK proteins modulate NOTCH signaling to influence a brown or white 3T3-L1 adipocyte fate. *Sci Rep.* 2018;8:16923.
47. Rodríguez-Cano M-M, González-Gómez M-J, Sánchez-Solana B, et al. NOTCH receptors and DLK proteins enhance brown adipogenesis in mesenchymal C3H10T1/2 cells. *Cells.* 2020;9.
48. Huang M, Zhang J, Xu H, et al. The TGF β -ERK pathway contributes to Notch3 upregulation in the renal tubular epithelial cells of patients with obstructive nephropathy. *Cell Signal.* 2018;51:139-151.
49. Lee SB, Kalluri R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int. Suppl.* 2010;S22-S26.
50. Xue L, Xie K, Han X, et al. Detrimental functions of IL-17A in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Surg Res.* 2011;171:266-274.
51. Peng X, Xiao Z, Zhang J, Li Y, Dong Y, Du J. IL-17A produced by both gammadelta T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J Pathol.* 2015;235:79-89.
52. Ramani K, Biswas PS. Interleukin 17 signaling drives Type I Interferon induced proliferative crescentic glomerulonephritis in lupus-prone mice. *Clin Immunol.* 2016;162:31-36.
53. Lavozy C, Matus YS, Orejudo M, et al. Interleukin-17A blockade reduces albuminuria and kidney injury in an accelerated model of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2019;95:1418-1432.
54. Baeten D, Baraliakos X, Braun J, et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England).* 2013;382:1705-1713.
55. Baeten D, Sieper J, Braun J, et al. Secukinumab, an interleukin-17A inhibitor, in ankylosing spondylitis. *N Engl J Med.* 2015;373:2534-2548.
56. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2012;366:1190-1199.
57. Mease PJ, McInnes IB, Kirkham B, et al. Secukinumab inhibition of interleukin-17A in patients with psoriatic arthritis. *N Engl J Med.* 2015;373:1329-1339.
58. Vijayaraghavan J, Osborne BA. Notch and T cell function - a complex tale. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1066:339-354.
59. Huang Q, Han L, Lv R, Ling L. Magnolol exerts anti-asthmatic effects by regulating Janus kinase-signal transduction and activation of transcription and Notch signaling pathways and modulating Th1/Th2/Th17 cytokines in ovalbumin-sensitized asthmatic mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2019;23:251-261.
60. Van Kooten C, Boonstra JG, Paape ME, et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:1526-1534.
61. Orejudo M, Rodrigues-Diez RR, Rodrigues-Diez R, et al. Interleukin 17A Participates In Renal Inflammation Associated To Experimental And Human Hypertension. *Front Pharmacol.* 2019;10:1015.
62. Fukuda D, Aikawa M. Expanding role of delta-like 4 mediated notch signaling in cardiovascular and metabolic diseases. *Circ J.* 2013;77:2462-2468.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Marquez-Exposito L, Rodrigues-Diez RR, Rayego-Mateos S, et al. Deletion of delta-like 1 homologue accelerates renal inflammation by modulating the Th17 immune response. *The FASEB Journal.* 2021;35:e21213. <https://doi.org/10.1096/fj.201903131R>